

UNIVERSITA' DI NAPOLI FEDERICO II

**DOTTORATO IN
BIOCHIMICA E BIOLOGIA CELLULARE E
MOLECOLARE**

TESI DI DOTTORATO, 2007

**L'INIBITORE DI POLI (ADPR) POLIMERASI PJ-34 COME ADIUVANTE
CHEMIOTERAPICO DEL CISPLATINO IN CELLULE
DI CARCINOMA UMANO.**

DOTTORANDA:

NADIA GAMBI

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA
STRUTTURALE E FUNZIONALE**

RELATORE:

Prof.ssa PIERA QUESADA

COORDINATORE:

Prof. GIUSEPPE D'ALESSIO

INDICE

SOMMARIO	pag. 2
SUMMARY	pag. 3
INTRODUZIONE	pag. 4
SCOPO, FASI ED ARTICOLAZIONE DELLA RICERCA	pag. 13
MATERIALI E METODI	pag. 14
1.Colture cellulari	pag. 14
2.Trattamento delle cellule con cDDP e PJ-34	pag. 14
3.Preparazione dell'omogenato cellulare	pag. 14
4.Isolamento di nuclei e citoplasma da cellule di carcinoma umano	pag. 15
5.Determinazione della concentrazione proteica	pag. 15
6.Determinazione dell'attività specifica PARP in omogenati cellulari	pag. 15
7.Determinazione dell'attivazione di PARP-1 in cellule in coltura	pag. 16
8.Analisi del ciclo cellulare per citofluorimetria	pag. 16
9.Analisi elettroforetica di proteine mediante gel di poliacrilammide in SDS (SDS-PAGE)	pag. 17
10.Western blotting	pag. 17
RISULTATI CAPITOLO I	pag. 19
Determinazione dell'effetto di cDDP +/- PJ-34 sulla crescita cellulare di linee di carcinoma umano	
1.1 Analisi dell'inibizione di crescita cellulare	pag. 19
1.2 Analisi della progressione del ciclo cellulare	pag. 27
RISULTATI CAPITOLO II	pag. 30
Definizione del coinvolgimento di PARP-1 nella segnalazione del danno al DNA indotto da cDDP	
2.1 Analisi dei livelli endocellulari basali di proteine bersaglio di poli(ADP)ribosilazione	pag. 30
2.2 Definizione dei livelli di attività specifica di PARP	pag. 30
2.3 Analisi dei livelli di poli(ADP)ribosilazione	pag. 32
2.4 Analisi dell'efficienza di inibizione da PJ-34 "in vitro" ed "in vivo"	pag. 36
2.5 Analisi dell'induzione di apoptosi da cDDP	pag. 38
DISCUSSIONE	pag. 44
BIBLIOGRAFIA	pag. 48

SOMMARIO

Gli inibitori delle poli(ADPR) polimerasi (PARP) potenziano gli effetti citotossici di agenti chemioterapici come i composti alchilanti. Infatti, una delle risposte immediate al danno sul DNA è la sintesi di poli (ADP)ribosio (PAR) ad opera delle PARP, componenti dei macchinari enzimatici di riparazione del DNA e substrato delle caspasi. Il cisplatino (cDDP) determina la formazione di addotti sul DNA che sono riconosciuti da proteine, come p53, anche bersaglio di poli(ADP)ribosilazione. Abbiamo paragonato gli effetti di trattamenti con cDDP e con l'inibitore delle PARP PJ-34 in tre tipi cellulari di carcinoma umano HeLa, KB ed HT-29, mutate nel gene per p53 che è noto influenzare la sensibilità al cisplatino. Esperimenti di dose-dipendenza hanno mostrato una differente sensibilità delle linee cellulari agli agenti, in termini sia di inibizione di crescita che di accumulo delle cellule in fase G2/M e di apoptosi. La dose ottimale per i co-trattamenti è stata scelta verificando preventivamente l'effetto di PJ-34 sulla crescita cellulare e la sua efficienza di inibizione sull'attività enzimatica. In cellule HT-29, resistenti al cisplatino abbiamo ritrovato: 1) un effetto adiuvante di PJ-34 sull'azione del cDDP come inibizione di crescita e alterazione del ciclo cellulare a dosi che di per se non alterano la progressione cellulare 2) l'attivazione cDDP-dipendente delle PARP, confermata dall'automodificazione di PARP-1. Inoltre sia in cellule sensibili (HeLa) che resistenti (HT-29) l'innescò dell'apoptosi è guidato dall'inattivazione di PARP-1 caspasi-dipendente. In base a tali evidenze è possibile definire la modulazione della poli(ADP-ribosilazione) una strategia adiuvante in chemioterapia, volta ad incrementare la morte per apoptosi di cellule cancerogene.

SUMMARY

Poly(ADPR)polymerases (PARPs) inhibitors potentiate the cytotoxic effects of chemotherapeutic agents like alkylating compounds. In fact, one of the earliest responses to DNA breaks is the synthesis of poly(ADP-ribose) (PAR) by PARPs that are known as components of DNA repair machineries and substrate of caspases. Cisplatin (cDDP) yields DNA cross-link and several proteins recognise cDDP-induced DNA damage such as p53, that are also target of poly(ADP-ribosyl)ation. We have compared the effects of treatments with cDDP and the PARPs inhibitor PJ-34 in HeLa, KB and HT-29 human carcinoma cell lines mutated in the p53 gene that is well known to influence the cellular sensibility to the cisplatin. Dose-dependent experiments showed differential sensitivities of cell lines to the drugs, in terms of cell growth inhibition, accumulation at the G2/M boundary of the cell cycle and onset of apoptosis. The optimal dose of the co-treatment has been chosen preventively verifying the effect of PJ-34 on cell growth and with the inhibition efficiency of the enzymatic activity. In HT-29 cells, resistant to cisplatin we found: 1) PJ-34 potentiation of cDDP-induced cell growth inhibition and cell cycle perturbation while PJ-34 alone has not shown to alter the cell cycle 2) cDDP dependent PARP(s) activation confirmed by PARP-1 auto-modification. Furthermore either in cDDP sensitive (HeLa) or resistant (HT-29) cells the induction of apoptosis was driven by caspase-dependent PARP-1 proteolysis. In conclusion, based on such evidences we could define the modulation of the poly(ADP-ribosylation) as a possible adjuvant strategy in chemotherapy, to increase the apoptosis of neoplastic cells.

INTRODUZIONE

La poli(ADP-ribosilazione) è una modifica post-traduzionale di proteine nucleari che gioca un ruolo centrale nel mantenimento dell'integrità genomica, come scelta del destino cellulare nonché mediante il controllo della riparazione, replicazione e trascrizione del DNA.

Il principale enzima responsabile della sintesi di poli(ADP-ribosio) (PAR) e quello ad oggi meglio caratterizzato nell'ambito di una ampia famiglia è la poli-(ADPR)polimerasi-1 (PARP-1), una proteina nucleare di circa 116 kDa, ubiquitaria, ritrovata in tutti gli eucarioti.

La reazione consiste nella sintesi di omopolimeri di PAR variabili per lunghezza e complessità e si esplica in più stadi:

- idrolisi del legame N-glicosidico tra la nicotinammide adenina-dinucleotide (NAD^+), usata come substrato, ed il ribosio, con eliminazione di nicotinammide e protoni e rilascio di molecole di adenosina-difosfato-ribosio (ADPR) utilizzate per la sintesi dei polimeri;
- formazione di un legame estereo tra la prima unità di ADPR ed uno specifico residuo amminoacidico, acido aspartico o glutammico, di accettori proteici nucleari. Questi ultimi possono essere proteine coinvolte nel mantenimento della struttura cromatinica, o enzimi implicati nel metabolismo del DNA, a carico delle quali si definisce una reazione detta di eteromodificazione che avviene principalmente mediante corti polimeri lineari (massimo 20-30 residui); nonché le PARP-1 e PARP-2 stesse, in tal caso si parla di una reazione di automodificazione che avviene mediante polimeri lunghi e ramificati

- allungamento della catena di ADPR tramite legame 1''-2' α -glicosidico di successivi monomeri da 2 a più di 200 residui in catena;
- ramificazione del polimero di ADPR ogni 20-50 unità tramite legami 1'''-2'' α -glicosidici (Meyer e coll.,2005) (figura 1).

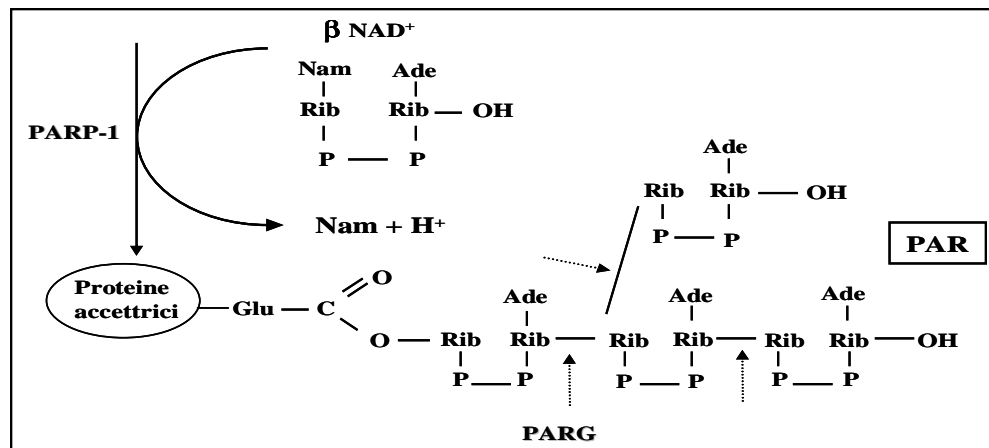


Fig.1. Meccanismo di poli(ADP)ribosilazione.

Alla rapida sintesi di PAR, fa seguito una sua rapida ed efficiente degradazione ad opera della poli(ADPR)glicoidrolasi (PARG). L'ultima molecola di ADPR, legata alla proteina accettrice viene eliminata ad opera di una ADPribosil-proteina-liasi (Cortes & Wang, 2005).

In condizioni basali i livelli cellulari di PAR, rappresentati da corti oligomeri, sono dell'ordine delle pmoli. Tuttavia, in risposta ad agenti genotossici, quantità di PAR nell'ordine delle nmoli, vengono rapidamente sintetizzate e degradate, con una vita media inferiore ad 1 minuto.

I polimeri di PAR hanno una elevata densità di cariche negative e perciò possono competere con il DNA per le interazioni elettrostatiche con le proteine basiche. I lunghi polimeri di PAR legati covalentemente alle PARP sono capaci di interagire non covalentemente con proteine nucleari mediante un dominio, comune a numerose proteine, quali ad esempio p53, p21, DNA-PK (Pleschke e coll., 2000).

PARP-1 ha una organizzazione modulare, in cui è possibile distinguere tre domini funzionali (Rolli e coll., 2000) (**figura 2**).

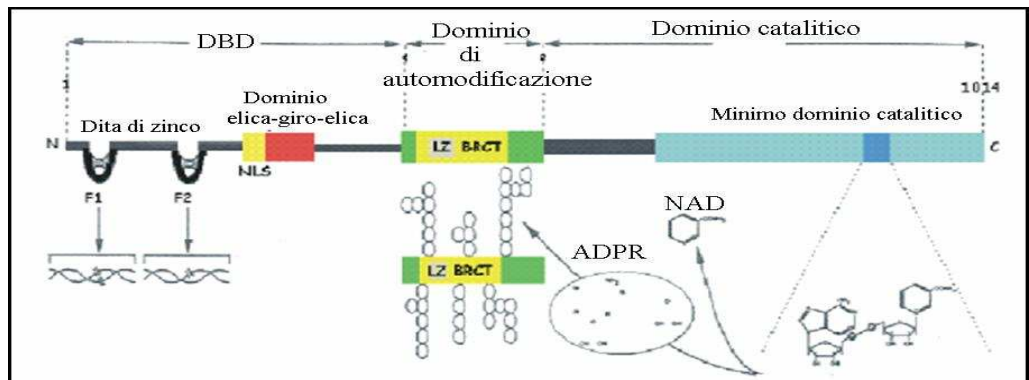


Fig.2. Struttura molecolare di PARP-1.

DBD (DNA binding domain)

NLS (Nuclear location signal)

LZ (Leucine zipper)

BRCT (Breast cancer C-terminus)

Il **dominio N-terminale** è responsabile dell'interazione con tratti di DNA interrotti mediante due motivi a “dita di zinco” e contiene due sequenze corrispondenti al segnale di localizzazione nucleare di PARP-1.

Il **dominio centrale** di automodificazione è molto ricco di residui di acido glutammico, che rappresentano i siti di legame per il PAR, e presenta un motivo a “cerniera di leucine” (leucin zipper), ed un motivo BRCT (Breast cancer c-terminus), responsabili delle interazioni proteina-proteina, come quelle che si instaurano tra le molecole di PARP e proteine accettrici con lo stesso motivo strutturale.

Il **dominio catalitico**, responsabile della sintesi di PAR, è evolutivamente conservato ed è presente in altre isoforme enzimatiche che vanno a definire una super-famiglia le cui componenti presentano localizzazione, struttura e funzioni diverse.

La PARP-2 presenta la più alta percentuale di identità con la PARP-1 (circa il 60%) con la quale condivide la capacità di legare il DNA danneggiato che ne determina l'attivazione, mentre possiede un ridotto dominio di automodificazione (*Schreiber e coll., 2005*).

La maggior parte degli studi convergono a definire un modello che prevede per PARP-1 e -2 un ruolo di segnalatore del DNA danneggiato ed il sistema PARP/PARG come meccanismo di trasduzione di tale segnale (*Malanga & Althaus, 2005*) (**figura 3**).

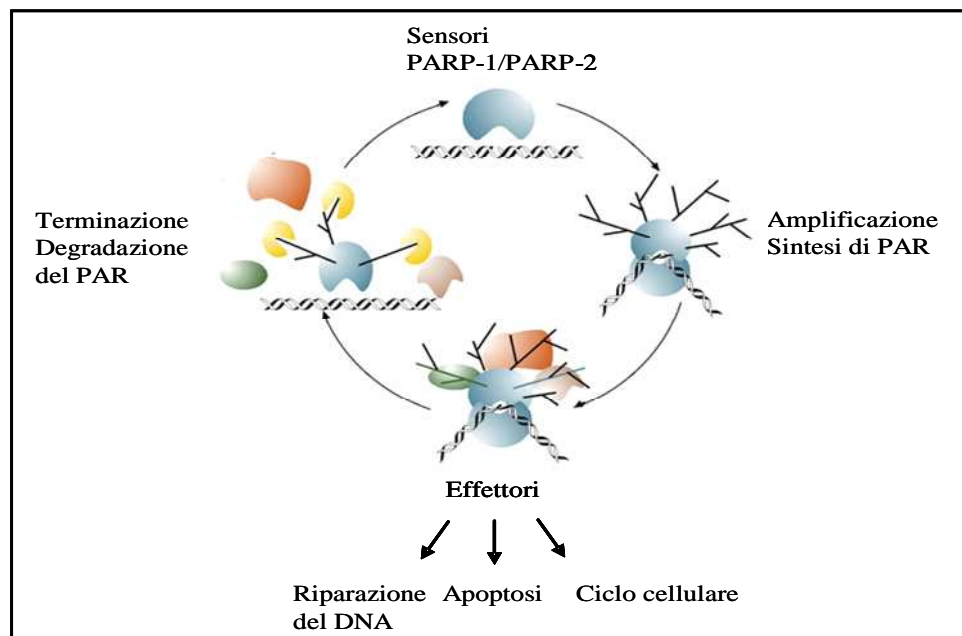


Fig.3. Meccanismo di segnalazione del danno al DNA ad opera di PARP-1 e -2.

Il modello prevede che PARP-1 e PARP-2 riconoscano il DNA danneggiato fungendo da "sensori del danno"; il legame all'acido nucleico porta all'attivazione dell'enzima con la produzione di polimeri di PAR lunghi e ramificati i quali agiscono da effettori reclutando sul sito danneggiato i macchinari enzimatici nucleari. L'estensione del danno al DNA può determinare il tipo di risposta e l'esito della segnalazione, come verrà chiarito in seguito. Infine, la terminazione del segnale avviene

attraverso la degradazione del PAR ad opera della PARG, con il conseguente ripristino dello stato attivo delle PARP.

PARP-1 è risultata coinvolta anche nella regolazione di diversi fattori di trascrizione sia mediante interazione proteina-proteina che PAR-proteina (*Lee Kraus & Lis, 2003*) e possiede la capacità di interagire con sequenze promotrici, di riconoscere particolari conformazioni del DNA, nonché, modificando gli istoni, di determinare una struttura cromatinica trascrizionalmente attiva. Viceversa, in presenza di danno al DNA e, quindi, di iperattivazione della PARP-1, si verifica l'inibizione dell'assemblaggio di complessi trascrizionali, a causa delle repulsioni elettrostatiche tra i polimeri legati alla PARP-1 con conseguente blocco della trascrizione che consente di riparare il DNA danneggiato.

Come già accennato, PARP-1 svolge un importante ruolo anche nella scelta tra sopravvivenza e morte cellulare, mediando inoltre tra necrosi e apoptosi. In presenza di basse quantità di danno al DNA, la PARP-1 può agire come una molecola promotrice della sopravvivenza come precedentemente illustrato. Viceversa, in seguito ad un danno eccessivo al DNA, l'iperattivazione della PARP induce la morte cellulare per necrosi, mediata dalla deplezione della scorta di NAD^+ e di ATP (*Viràg, 2005*).

L'apoptosi, invece, richiede energia sotto forma di NAD^+ e di ATP, ed è garantita dall'azione di proteasi specifiche (caspasi) che proteolizzano la PARP-1, generando due frammenti, uno di 89 kDa e l'altro, di 24 kDa. La sua frammentazione serve a sopprimere l'iperattivazione dell'enzima che, in seguito al depauperamento delle energie della cellula, forzerebbe verso la morte cellulare per necrosi.

Dal momento che è stato dimostrato che l'inibizione della PARP-1 impedisce la riparazione del DNA lesionato, sembra possibile indurre un ripristino dell'apoptosi in cellule neoplastiche in seguito all'azione combinata degli inibitori della poli(ADP-ribosilazione) e di agenti antineoplastici.

I primi inibitori della PARP-1 identificati sono stati 3-amminobenzammide (3-ABA) e 3-metossibenzammide (3-MB). Successivi studi hanno permesso la creazione di altri composti ad attività inibitoria, indicati come "i nuovi inibitori di PARP". Ne sono un esempio l'NU1025 (8-idrossi-2-metilquinazolinone-4-(3H)-I) ed il più recente PJ-34 [N-(6-oxo-5,6-dihydro-phenanthridin-2-yl)-N,N-dimethylacetamide], che ha mostrato effetti terapeutici in varie patologie (*Jagtap & Szabò, 2005*).

Sulla base di dati molto promettenti circa l'incremento dell'azione antitumorale di agenti alchilanti o di inibitori di topoisomerasi da parte di "nuovi inibitori di PARP" è sembrato interessante estendere le analisi ad un altro agente chemioterapico quale il cisplatino (*Cimmino e coll., 2007*).

Il cisplatino, [cis-diamminodichloroplatino(II)], o cDDP, è uno degli agenti chemioterapici più utilizzati nella cura di un'ampia varietà di tumori ed è risultato particolarmente valido nei tumori testicolari.

Il cisplatino determina la formazione sul DNA di addotti di tipo intra- ed inter-filamento tra guanine e legami crociati tra una guanina e proteine (*Eastman, 1983*).

La tossicità del cisplatino si manifesta, in modo dipendente dalla sua concentrazione, portando alla morte cellulare sia per apoptosi che per necrosi. Infatti, trattamenti con alte dosi di cisplatino inducono una morte

per necrosi. Viceversa, trattamenti con basse dosi di cisplatino causano una morte per apoptosi che può avvenire per azione delle caspasi sia in seguito all'attivazione di Fas sia per aumento della permeabilità mitocondriale con il rilascio del citocromo c e di AIF (Apoptosis inducing factor) (*Gonzalez e coll., 2001*). Fondamentale al processo apoptotico indotto dal cisplatino è l'arresto del ciclo cellulare in fase G2/M correlato all'inibizione della defosforilazione della chinasi p34^{cdc2} ed ad un aumento dell'espressione di p16 e p53 (*Demarcq e coll. 1994; Yip e coll. 2006*).

I danni al DNA causati dal cisplatino sono in grado di modulare diversi sistemi di trasduzione del segnale innescando differenti risposte cellulari (*Wang & Lippard, 2005*). La letteratura mostra dati contrastanti circa il ruolo di p53 in tale contesto. E' noto come p53 possa giocare un ruolo sia nell'innescare dell'apoptosi che nel promuovere la sopravvivenza cellulare. La sensibilità al cisplatino correla con la presenza di una p53 attiva, in accordo con dati che evidenziano una maggiore resistenza ai trattamenti in cellule mutate per p53 (*Kigawa e coll., 2002*). Viceversa altri dati indicano che una mutazione in p53 incrementa la sensibilità al cisplatino, attraverso l'inibizione dell'arresto del ciclo cellulare e conseguente minore riparazione del DNA (*Pestell e coll., 2000*).

Tali discordanze possono essere spiegate considerando che a seconda del tipo cellulare e dell'entità del danno, gli addotti prodotti dal cDDP sono riconosciuti da diversi sistemi di riparazione che possono o meno dimostrarsi efficienti nella rimozione delle lesioni al DNA.

La rimozione degli addotti generati dal cisplatino è a carico principalmente del NER (Nucleotide excision repair), ma può avvenire

anche mediante il sistema di riparazione HRR (Homologous recombinational repair) (*Zhou e coll., 2005*).

Diverse proteine contenenti il dominio HMG (High mobility group) sono in grado di riconoscere gli addotti del cisplatino e legando i siti platinati bloccano l'accesso alle proteine del NER potenziando così la citotossicità indotta dal cisplatino (*Huang e coll., 1994*).

Evidenze suggeriscono un modello secondo il quale le proteine MMR (Mismatch repair) generano un ciclo futile che provoca un accumulo di addotti con conseguente morte cellulare per apoptosi (*Fink e coll., 1996*).

Il coinvolgimento del sistema di riparazione BER (Base excision repair) si basa sull'osservazione che la proteina MPG, lega i siti platinati richiamando le proteine del NER (*Miao e coll., 2000*).

Inoltre la presenza degli addotti del cisplatino determina l'inibizione di DNA-PK (DNA-dependent protein kinase), componente del sistema di riparazione non omologo NHEJ (Non-homologous end joining) e DSB (Double strand break), innescando l'apoptosi (*Turchi e coll., 2000*).

Il verificarsi di fenomeni di resistenza rappresenta il più comune svantaggio nell'applicazione dei trattamenti chemioterapici. Purtroppo, anche nel caso del cisplatino, esistono meccanismi di resistenza che si diversificano a seconda del contesto cellulare; essi includono: un minore afflusso con una diminuzione dell'accumulo dell'agente nella cellula, l'inattivazione da parte del glutatione, un'alterazione dei livelli di proteine adibite ai sistemi di riparazione.

D'altro canto è stato dimostrato che uno squilibrio tra i livelli di fattori pro ed anti-apoptotici possa indirizzare la cellula verso la sopravvivenza anziché l'apoptosi (*Eliopoulos e coll., 1995*).

Numerosi composti analoghi del cisplatino, sono stati testati in base alla loro attività tumorale, ma solo alcuni hanno mostrato un'effettiva attività paragonabile al cisplatino in test clinici. Quindi, per ovviare alla resistenza di tale chemioterapico un approccio frequente riguarda la ricerca di composti che possano agire in sinergismo con esso.

L'evidenza di un aumento dell'attività poli(ADPR)polimerasica in cellule trattate con cisplatino (*Burkle e coll., 1993*), fa dell'inibizione delle PARP una promettente strategia anti-resistenza. L'evidenza che topi knockout per PARP-1 presentano una maggiore sensibilità ad agenti alchilanti, senza determinare la predisposizione a sviluppare tumori di per se, ha rafforzato l'idea che gli inibitori delle PARP possano agire da adiuvanti nelle chemioterapie (*Shibata e coll., 2005*). Analisi *in vitro*, hanno dimostrato un aumento della citotossicità in cellule resistenti al cisplatino in presenza dell'inibitore delle PARP 3-amminobenzammide (3-ABA), con innesco dell'apoptosi (*Nguewa e coll., 2006*); inoltre l'uso dell'inibitore CEP-6800 porta anche "*in vivo*" ad una regressione del tumore (*Miknyoczki e coll., 2003*).

La creazione di nuovi inibitori della poli(ADP)ribosilazione idrosolubili e disponibili per somministrazione orale, quali PJ-34, incrementa le prospettive di utilizzo in ambito clinico.

SCOPO, ARTICOLAZIONE E FASI DELLA RICERCA

La farmacoresistenza intrinseca o acquisita delle cellule tumorali è la principale causa dell'insuccesso terapeutico all'inizio del trattamento o dopo una iniziale risposta alla chemioterapia al cisplatino.

La poli(ADP-ribosilazione) é collegata a diverse patologie quali cancro, diabete, asma e numerosi sforzi sono stati indirizzati alla modulazione della PARP-1 in diverse strategie terapeutiche. Inibitori sempre più specifici quali chinazolinoni sostituiti (NU1025) o composti di nuova sintesi (GPI15427, PJ-34), sono in uso anche come adiuvanti radio- e chemioterapici in diverse linee di cellule tumorali. Tuttavia i meccanismi che sottendono l'effetto terapeutico osservato sopprimendo l'attività di PARP-1 non sono ancora conosciuti.

In tale ambito il mio lavoro di ricerca ha riguardato il ruolo di PARP-1 come segnalatore del danno al DNA derivante da cisplatino in cellule neoplastiche sensibili (HeLa, KB) e resistenti (HT-29), prive di una p53 funzionale. Un inibitore delle PARP di nuova generazione ed idrosolubile PJ-34 è stato utilizzato in combinazione con l'agente chemioterapico cisplatino al fine di valutarne i possibili effetti adiuvanti.

Le analisi eseguite hanno preso in esame:

- la vitalità cellulare in seguito a trattamenti singoli e combinati
- le variazioni del ciclo cellulare
- le principali caratteristiche della reazione di poli(ADP-ribosilazione), quali l'attività specifica delle PARP, i livelli di PAR.
- lo stato funzionale di PARP-1 e di altre proteine implicate nell'innescio del processo apoptotico

MATERIALI E METODI

1. Colture cellulari

Le tre linee cellulari, HeLa, KB ed HT-29 sono state amplificate in terreno di coltura composto da DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), supportato con 10% di siero fetale bovino (*Bio Whittaker*) scomplementato per 1 ora a 56 °C, penicillina 100 U/mL, streptomicina 100 µg/ml e glutammina 5 mM (*Cambrex*). A tempi stabiliti le cellule sono state staccate con una soluzione di Tripsina 0.05%, EDTA 0.02%, (*Cambrex*), contate in camera Burker al microscopio invertito, previa colorazione in Trypan blue (*Biorad*) (1%) e successivamente piastrate a 1×10^6 cellule in dischi petri da 100 mm (*Corning Incorporated*). Le cellule sono state incubate a 37° C in atmosfera umidificata di 95% aria e 5% CO₂.

2. Trattamento delle cellule con cDDP e PJ-34

A 24 ore dal piastramento il terreno è stato allontanato e sostituito con terreno fresco contenente cDDP 1-50 µM (*Sigma*) e PJ-34 0.25-5 µM (*Alexis*). Dopo diversi tempi di trattamento con cDDP (4-24 ore con successivo tempo di recupero) e PJ-34 (24-72 ore), le cellule sono state staccate.

3. Preparazione dell'omogenato cellulare

Le cellule sono state risospese alla concentrazione di 7.5×10^3 cellule/mL in tampone PB (Tris-HCl 40 mM pH 7.8, EDTA 0.6 mM, β-mercaptoetanol 1 mM, MgCl₂ 30 mM, Triton X-100 0.05% e glicerolo 20%), contenente un "cocktail" di inibitori di proteasi (*Boehringer*) utilizzato come indicato dalla casa produttrice, e PMSF 1 mM, e permeabilizzate in ghiaccio per 30 minuti.

4. Isolamento di nuclei e citoplasma da cellule umane

Le cellule sono state risospese in tampone “A” (Tris-HCl 30 mM pH 7.5, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10 mM, Triton X-100 1%, Glicerolo 20%, inibitori di proteasi e PMSF 2 mM), alla concentrazione di 1x10⁷ cellule/mL e l'omogenizzazione effettuata per 30 minuti in ghiaccio. Dopo centrifugazione a 960 g per 30 secondi a 4° C il sopranatante, contenente il citoplasma, è stato conservato a freddo. Il precipitato è stato risospeso in tampone “A”, per 15 minuti in ghiaccio e ricentrifugato a 960 g per 30 secondi a 4° C. Il precipitato contenente i nuclei, è stato risospeso in tampone isototonico (Hepes 20 mM pH 7.9, KCl 20 mM, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, Glicerolo 25%).

5. Determinazione della concentrazione proteica

La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo di Lowry (*Lowry e coll., 1951*), utilizzando albumina di siero bovino (BSA, *Pierce*) come standard.

6. Determinazione dell'attività specifica PARP in omogenati cellulari

L'attività specifica poli(ADPR)polimerasica è stata determinata in omogenati cellulari (50 µg di proteine) incubati a 30° C per 15 minuti, in presenza di NAD 0.4 mM, [¹⁴C]-NAD⁺ (*Amersham Bioscience*) (10000 cpm/nmole), in tampone PB contenente DNAsi I (*Sigma*) 0.05 mg/mL, in un volume finale di 50µL. Al termine dell'incubazione, la reazione è stata interrotta con TCA freddo 40% (v/v). Il precipitato ottenuto è stato lavato mediante filtrazione su carta Millipore (HAWP 000 10; 0.45 µm), con TCA freddo 7% e la radioattività ad esso associata è stata determinata mediante scintillazione liquida (*Spettrometro Beckman LS 1701*). Una unità enzimatica corrisponde, alla quantità di enzima in

grado di determinare la produzione di una μ mole di PAR nell'unità di tempo (1 minuto) e nell'unità di volume (1 mL).

7. Determinazione dell'attivazione di PARP-1 in cellule in coltura

A cellule controllo e trattate, dopo allontanamento del terreno di coltura, sono stati aggiunti 0.5 mL per piastra di una soluzione Tris-HCl 56 mM pH 7.5, KCl 28 mM, NaCl 28 mM e $MgCl_2$ 2 mM, contenente come agente permeabilizzante digitonina 0.01% (*Sigma*) ed incubate con [32 P]-NAD $^{+}$ [10×10^6 cpm/nmol] 7.5 μ Ci / 10^6 cellule. per 1 ora a 37° C. Dopo essere state staccate e trasferite in provetta, le cellule sono state sottoposte a centrifugazione a 10600 g, a 4° C per 10 minuti ed a cinque lavaggi del precipitato con la soluzione usata in precedenza. Il precipitato, risospeso in tampone PB è poi stato analizzato per autoradiografia e per western blotting

8. Analisi del ciclo cellulare per citofluorimetria

Le cellule sono state centrifugate a 150 g 4° C per 10 minuti, lavate in PBS che è poi stato allontanato per centrifugazione a 150 g, 4° C per 10 minuti. Il pellet cellulare è stato fissato in 1 mL di Metanolo puro. Il Metanolo residuo è stato allontanato mediante 2 lavaggi con PBS freddo, centrifugato a 150 g, 4° C per 10 minuti ed il pellet cellulare è stato reidratato in 1 mL di PBS per 30 minuti in ghiaccio e successivamente centrifugato a 150 g a 4° C per 10 minuti. Quindi le cellule sono state risospese alla concentrazione di 1×10^6 cellule/mL di PBS contenente RNAsi A (*Sigma*) 0.05 mg/mL ed incubate per 20 minuti a temperatura ambiente, durante i quali si è effettuata la conta cellulare. La quantità corrispondente ad 1×10^6 cellule è stata risospesa in Ioduro di Propidio (25 μ g/mL) - SodioCitrato (0.1%), e sottoposta all'analisi del contenuto di DNA

utilizzando un citofluorimetro a flusso laminare (*FacsCalibur*, *Becton Dickinson*), interfacciato con postazione PC dotata di software CyCLOPS[®] Summil (*Cytomation*, *Fort Collins*) per l'analisi dei dati. La fluorescenza generata dall'eccitazione del colorante con una sorgente laser 488 nm, è registrata tra 580 e 750 nm ed i dati raccolti sono stati analizzati attraverso il programma Mod Fit LT 2.0 (*Verity Software House Inc.*).

9. Analisi elettroforetica di proteine mediante gel di poliacrilammide in SDS (SDS-PAGE)

Aliquote pari a 120 µg di proteine dell'omogenato cellulare sono state precipitate con TCA 40% (v/v) e dopo 20 minuti in ghiaccio sono state sottoposte a centrifugazione a 4° C per 15 minuti a 1300 g. Il TCA residuo è stato allontanato mediante lavaggi con etanolo 100% freddo, attraverso una serie di tre centrifugazioni a 10600 g, 4° C per 10 minuti ed i precipitati, dopo totale evaporazione dell'etanolo, sono stati risospesi direttamente in tampone Laemli 2x (Tris-HCl 125 mM, SDS 2%, Glicerolo 20%, β-mercaptoetanol 250 mM, Blu di Bromofenolo 0.05%). L'analisi elettroforetica è stata condotta utilizzando mini gel (10x8x0.1cm) a gradiente di concentrazione di poliacrilammide (5-15%). La corsa elettroforetica è stata effettuata ad amperaggio costante (12-15 mA) in tampone di corsa (Tris 25 mM/Glicina 192 mM pH 8.8, SDS 0.1%). Come markers di peso molecolare sono stati utilizzati miscele di proteine standard da 7 a 250 kDa di peso molecolare (*Biorad*).

10. Western blotting

I campioni proteici dopo separazione elettroforetica sono stati trasferiti su membrana di PVDF (polyvinylidene difluoride, *Millipore*) mediante

elettroblotting (*Biorad Transblot System*) in tampone di trasferimento (Tris 25 mM/Glicina 192 mM pH 8.8, SDS 0.025%). Il trasferimento è stato condotto a 4° C per 120 minuti ad amperaggio costante di 200 mA oppure per la notte a 100 mA. Il filtro è stato poi equilibrato in tampone TBST (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM e Tween-20 1%) e successivamente incubato per 1 ora a temperatura ambiente in TBST contenente proteine del latte al 3% (*Biorad*), per saturare eventuali siti non specifici di legame. La successiva incubazione con anticorpi primari, diluiti in tampone TBST contenente latte all' 1%, è stata effettuata per 2 ore a temperatura ambiente. Sono stati utilizzati anticorpi primari policlonali anti-actina (I-19, *S.Cruz*) (1:1000), anti-PARP-1 (H-250, *S.Cruz*) (1:2000), anti-p53 (FL-393, *S.Cruz*) (1:1000), anti-PCNA (FL-261, *S.Cruz*) (1:500), anti-DNA-PK (M-308, *S. Cruz*) (1:200), ed anticorpi monoclonali anti-PAR (H-10, *Alexis*) (1:500), anti-AIF (E-1, *S. Cruz*) (1:500). Dopo 5 lavaggi da 5 minuti in TBST, il filtro è stato incubato per 1 ora e mezza a temperatura ambiente con anticorpi secondari anti-mouse (*Biorad*) (1:2000) ed anti-rabbit (*Biorad*) (1:4000), coniugati alla perossidasi. Il filtro è stato, infine, sottoposto ad ulteriori lavaggi e l'attività perossidasi è stata rivelata per chemiluminescenza (Luminol Reagent, *S.Cruz*) e successiva esposizione utilizzando il Chemi-doc (*Biorad*). L'analisi densitometrica è stata effettuata utilizzando il densitometro GS-710 (*Biorad*) ed il programma Quantity one.

RISULTATI

CAPITOLO I

Determinazione dell'effetto di cDDP +/- PJ-34 sulla crescita cellulare di linee di carcinoma umano

1.1 -Analisi dell'inibizione di crescita cellulare

Le prime analisi hanno preso in esame cellule di adenocarcinoma della cervice uterina HeLa, sottoposte a trattamenti con diverse dosi di cDDP per differenti tempi. In **figura 4 A** sono mostrati i risultati di esperimenti effettuati utilizzando cDDP 10, 33 e 50 μM per 12, 24 e 48 ore. Si può notare come la dose di 50 μM provochi a partire da 12 ore una forte citotossicità, mentre dosi corrispondenti a 10 e 33 μM determinino un'inibizione della crescita del 50% a 24 ore che raggiunge a 48 ore un valore dell'80%. Evidenziata quindi una forte sensibilità della linea cellulare al trattamento con cDDP, si sono effettuate incubazioni con dosi ridotte e per tempi minori. La **figura 4 B** mostra i risultati di trattamenti con dosi di cDDP 1 e 10 μM condotti per 4 e 24 ore cui fanno seguito tempi di recupero in presenza di terreno fresco. Da tali esperimenti si è estrapolato come la dose di cDDP 1 μM abbia un effetto citostatico analogo ai due tempi utilizzati, per cui negli esperimenti successivi si è deciso di ridurre a 4 ore il tempo di trattamento. Le analisi sono inoltre state estese ad altre linee cellulari per valutare una diversa sensibilità al cDDP di carcinomi di diversa derivazione. In **figura 5 A** sono riportati i risultati di esperimenti effettuati su cellule di carcinoma oro-faringeo KB, con cDDP (1-5-10-33 e 50 μM). Anche in tali cellule è stata osservata una inibizione di crescita a partire dalla dose 5 μM , mentre la dose 1 μM ha determinato un rallentamento della crescita entro le 24 ore, cui segue un recupero.

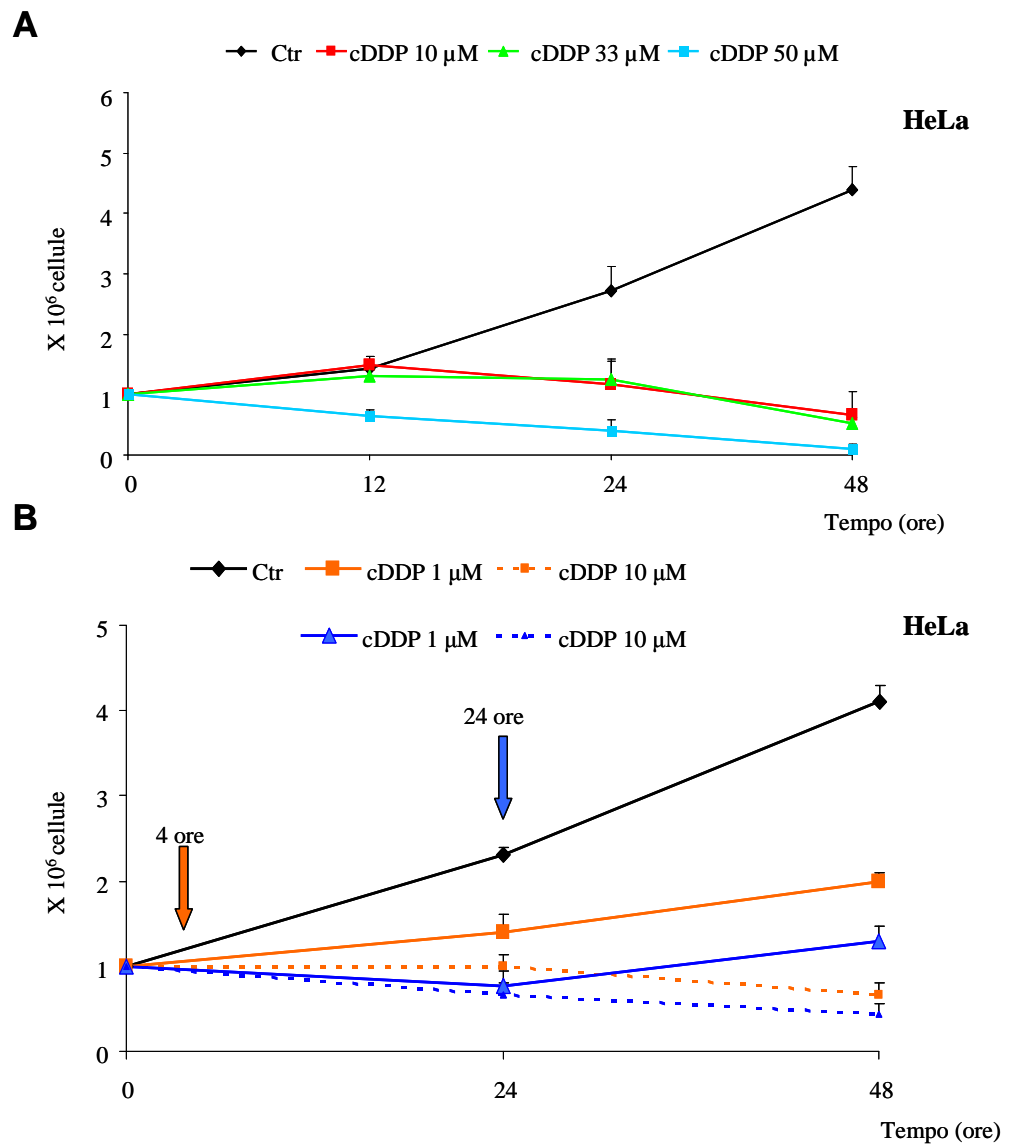


Fig. 4 Analisi dell'inibizione di crescita indotta da cDDP nella linea cellulare HeLa.

A. Effetto dose risposta al trattamento con cDDP 10- 50 μ M per 12-48 ore.

B. Effetto dose risposta al trattamento con cDDP 1- 10 μ M per 4 e 24 ore.

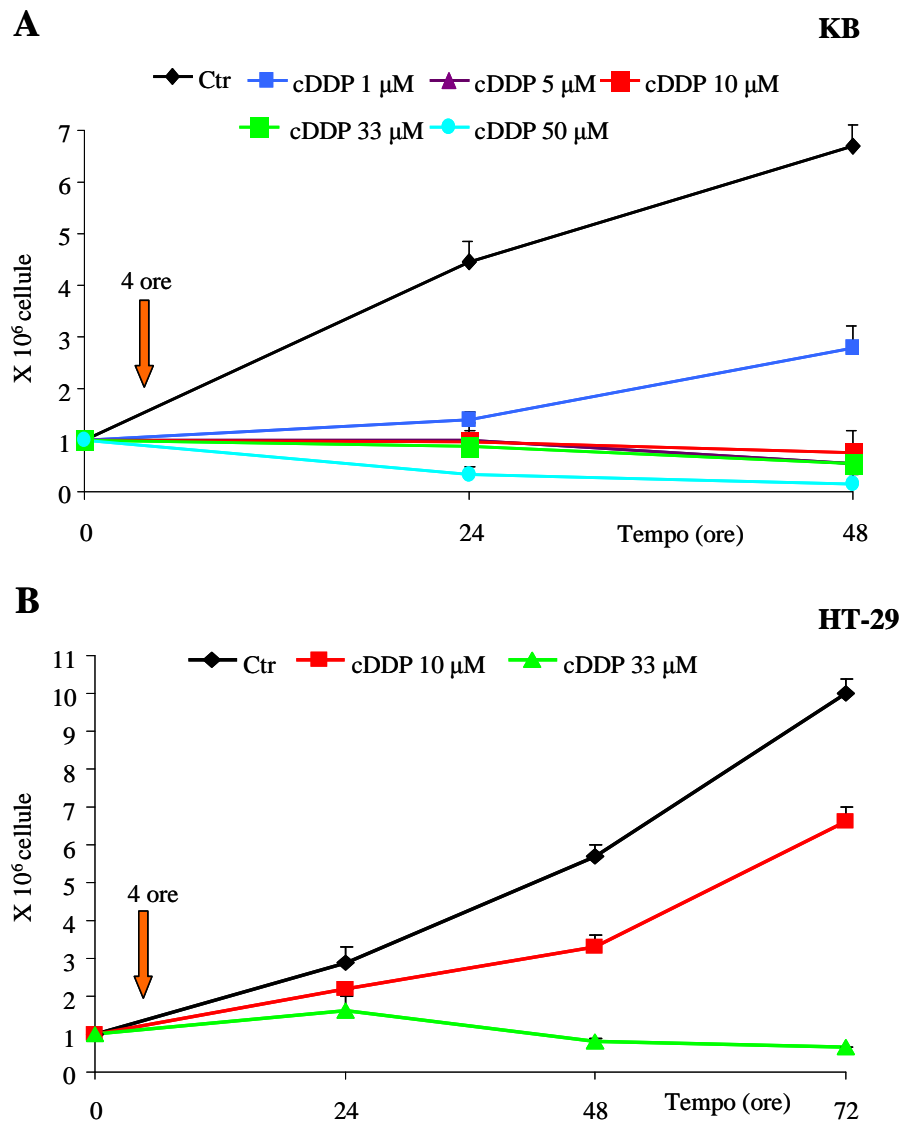


Fig. 5 Analisi dell'inibizione di crescita indotta da cDDP nelle linee cellulari KB ed HT-29.

A. Effetto dose risposta al trattamento di 4 ore con cDDP 1-50 μM nelle cellule KB.

B. Effetto dose risposta al trattamento di 4 ore con cDDP 10-33 μM nelle cellule HT-29.

Alla ricerca di un modello cellulare che non evidenziasse una marcata citotossicità al cDDP sono state prese in esame cellule di carcinoma del colon HT-29. La **figura 5 B** mostra come tali cellule siano significativamente meno sensibili al cDDP; la dose di 10 μM infatti ha determinato un transitorio rallentamento della crescita cellulare recuperabile in 48 ore. Tale modello cellulare è stato quindi ritenuto idoneo agli esperimenti di trattamenti combinati cDDP ed inibitori delle PARP. Preliminarmente si è verificato l'effetto sulla crescita cellulare di inibitori delle PARP. Esperimenti di dose risposta hanno mostrato che sia 3-ABA che PJ-34 sono in grado di alterare la crescita cellulare. In particolare 3-ABA produce una stasi della proliferazione di cellule HeLa che perdura sino a 48 ore alla concentrazione di 1 mM (che è noto determinare una inibizione enzimatica del 90%) (**figura 6 A**). Inoltre le cellule hanno mostrato una diversa sensibilità al PJ-34 utilizzato a dosi micromolare in relazione alla sua maggiore efficienza di inibizione (**figura 16**). In particolare le cellule HT-29 sono risultate più resistenti poiché la dose di PJ-34 5 μM non ha determinato conseguenze significative sulla crescita cellulare (**figura 6 B**, **figura 7**). Si è proseguito quindi col mettere a punto trattamenti combinati cDDP+/-PJ-34 da cui si potesse evidenziare un effetto sinergico dell'inibitore delle PARP sull'azione del cDDP. Dosi di cDDP 1 μM e PJ-34 0.25 μM hanno mostrato un limitato effetto sinergico del 22% nelle cellule HeLa a 24 ore di trattamento (**figura 8**). Un sinergismo più significativo si è registrato in cellule HT-29, pari al 23% alle 48 ore di trattamento con cDDP 10 μM e PJ-34 1 μM (**figura 9 A**). Tale effetto è stato inoltre osservato con la combinazione cDDP 10 μM e PJ-34 5 μM con un valore del 31% che perdura sino alle 72 ore (**figura 9 B**).

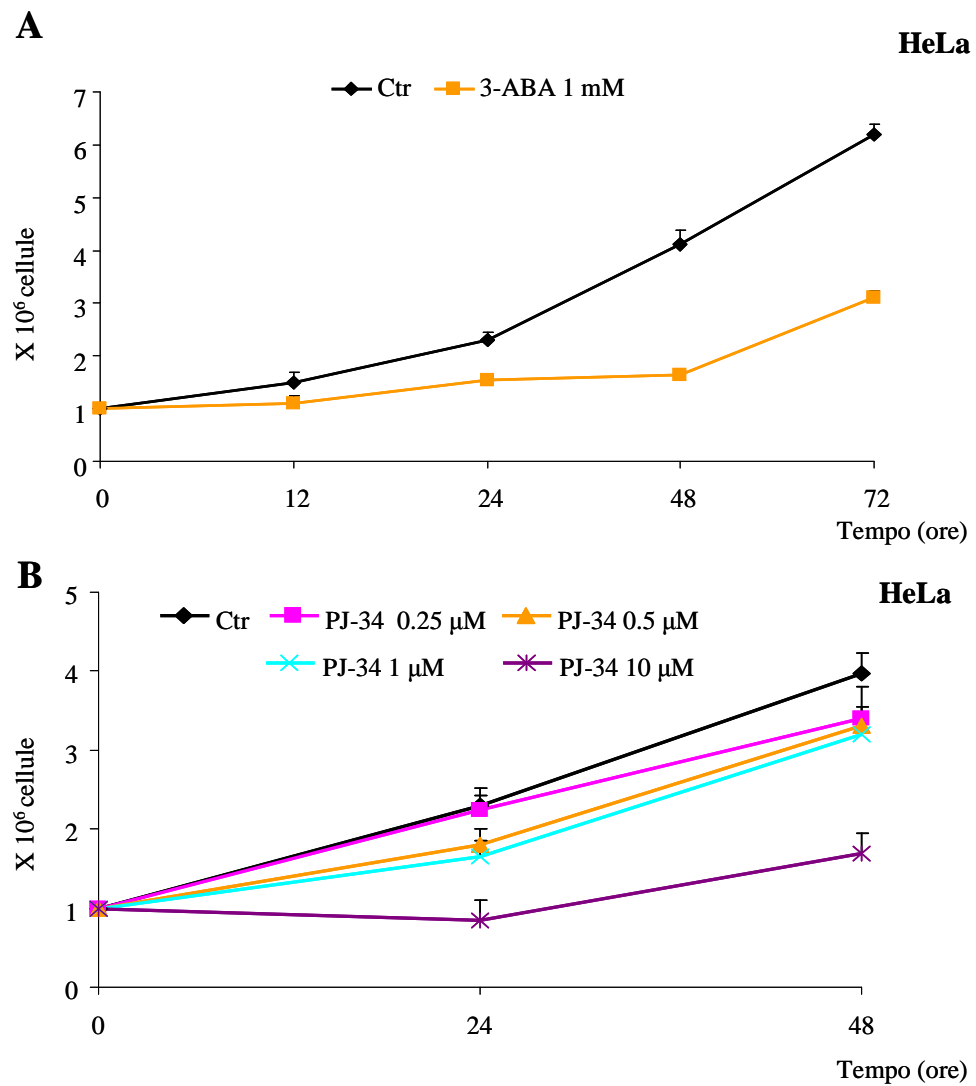


Fig. 6 Analisi della citostaticità indotta da inibitori delle PARP nella linea cellulare HeLa.

A. Effetto dose risposta al trattamento con 3-ABA 1 mM.

B. Effetto dose risposta al trattamento con PJ-34 0.25- 10 μ M.

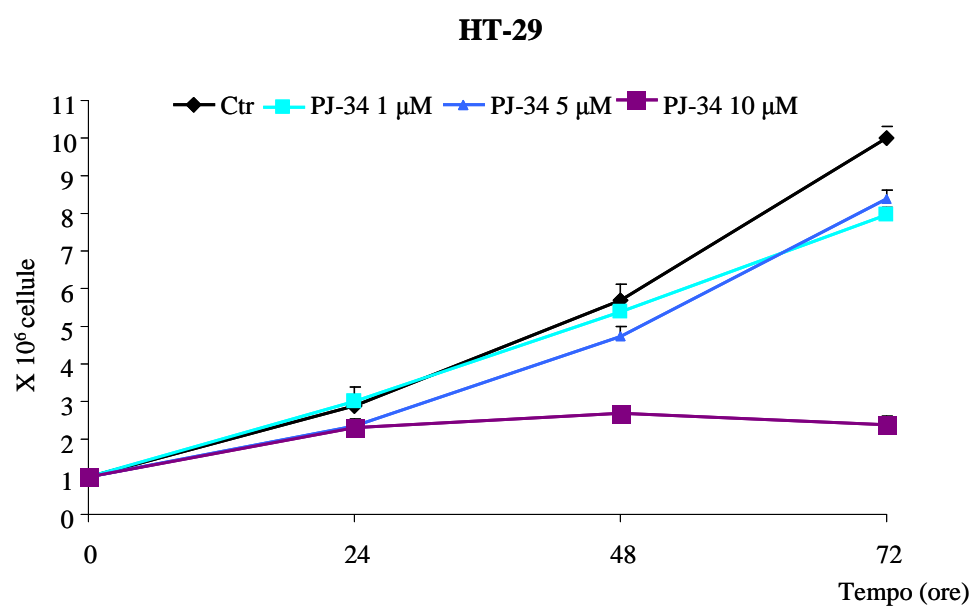


Fig. 7 Analisi della sensibilità all'inibitore delle PARP PJ-34 nella linea cellulare HT-29.

Effetto dose risposta al trattamento con PJ-34 1-10 μ M in cellule HT-29.

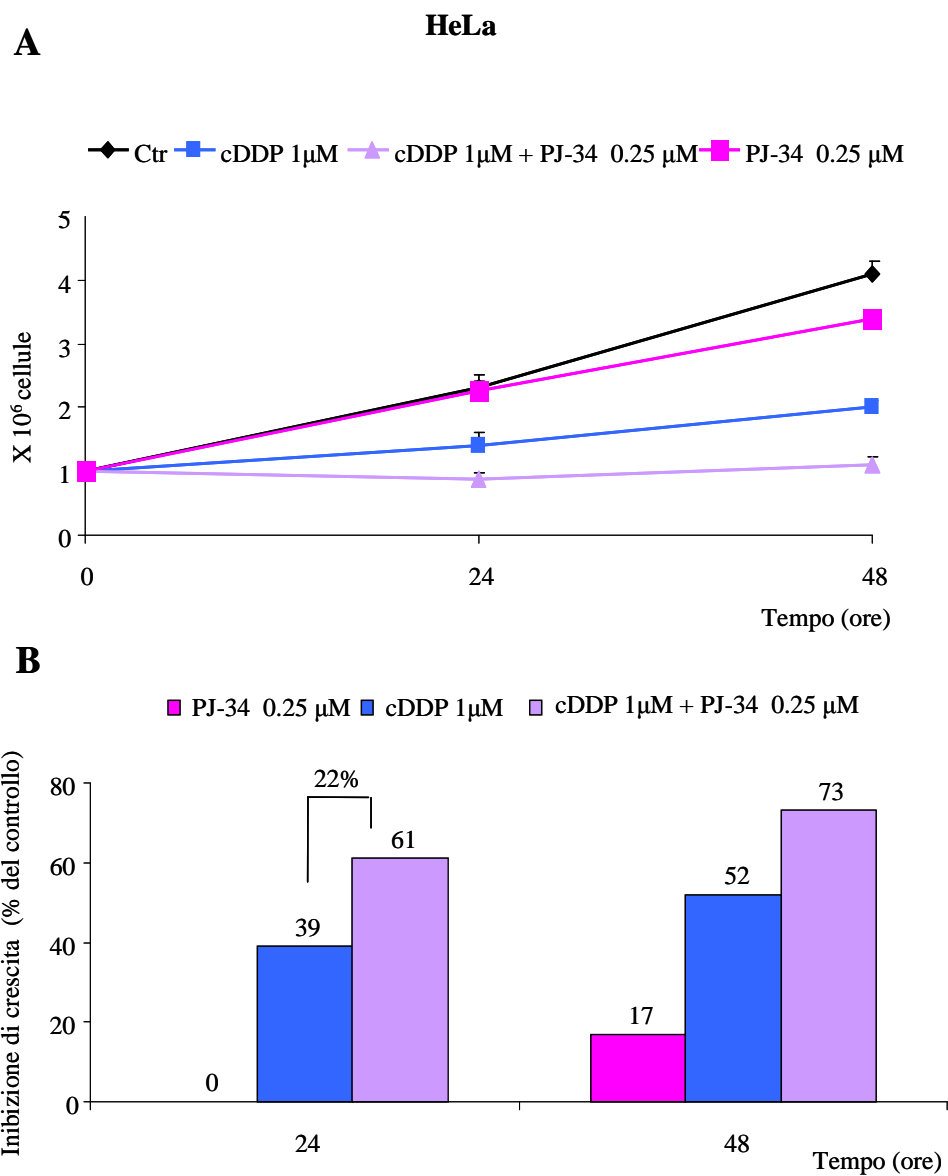


Fig. 8 Co-trattamenti cDDP +/- PJ-34 nella linea cellulare HeLa.

A. Trattamento combinato con cDDP 1 μ M e PJ-34 0.25 μ M in cellule HeLa.

B. Analisi quantitativa del trattamento combinato con cDDP 1 μ M e PJ-34 0.25 μ M in cellule HeLa.

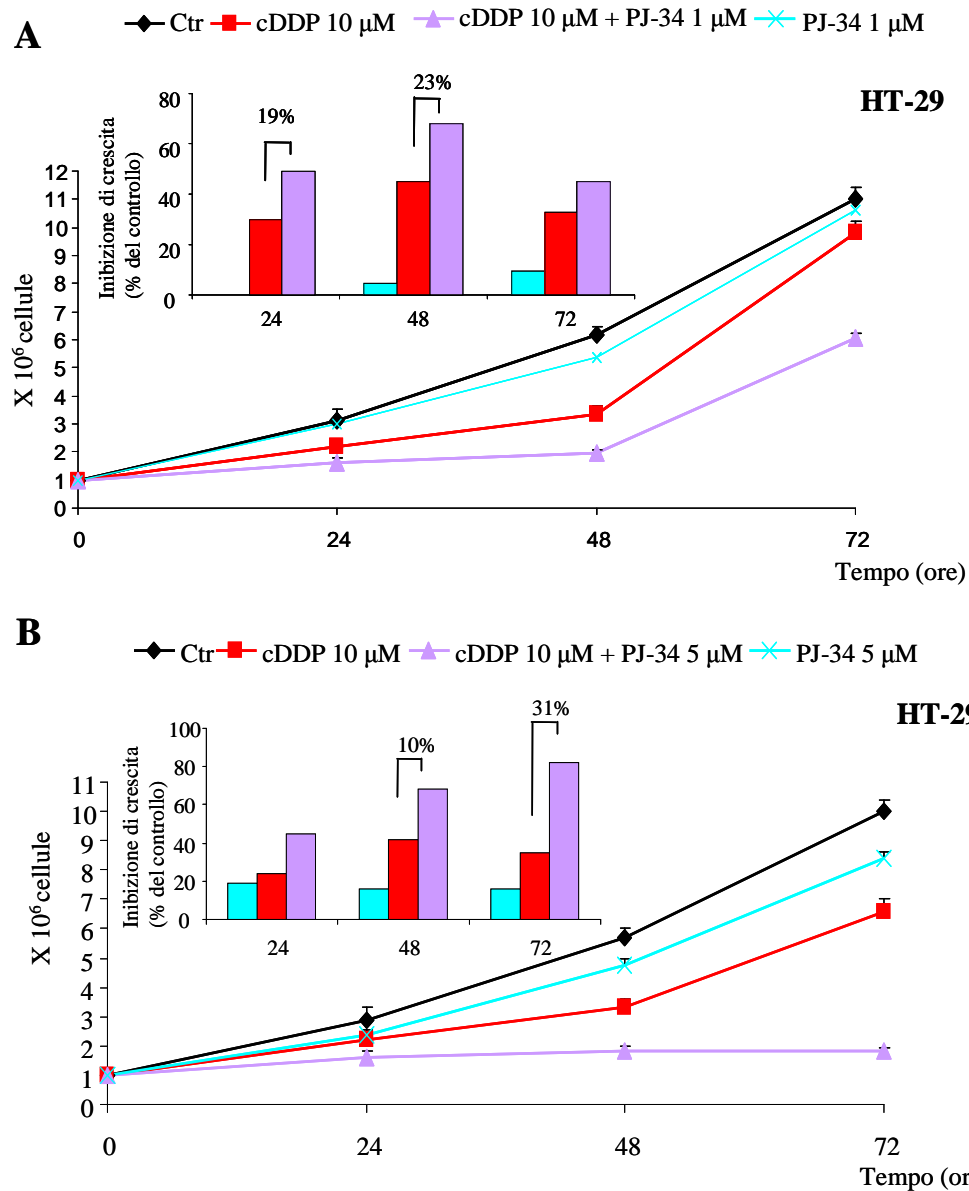


Fig. 9 Co-trattamenti cDDP +/- PJ-34 nella linea cellulare HT-29.

A. Trattamento combinato con cDDP 10 μ M e PJ-34 1 μ M in cellule HT-29.

B. Trattamento combinato con cDDP 10 μ M e PJ-34 5 μ M in cellule HT-29.

1.2 -Analisi della progressione del ciclo cellulare

L'effetto dei due agenti sulla crescita cellulare è stato analizzato anche in termini di alterazione del ciclo cellulare. Mediante citofluorimetria si è osservato che l'inibizione di crescita indotta da cDDP è dovuta ad un accumulo delle cellule in fase G2/M. Tale effetto è risultato del 20% in cellule HeLa dopo 24 ore di trattamento con cDDP 1 μ M cui segue un recupero. In cellule HT-29 invece in seguito a trattamento con cDDP 10 μ M, si è osservato un accumulo delle cellule in fase G2/M che perdura nel tempo. Inoltre in tale ambito è stato evidenziato come il PJ-34 utilizzato alla dose 5 μ M, che non altera di per se il ciclo delle cellule HT-29, sia in grado di incrementare e stabilizzare nel tempo il blocco in G2/M indotto da cDDP, (**figure 10-11**), dando luogo ad un più complessivo squilibrio della progressione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo.

HeLa

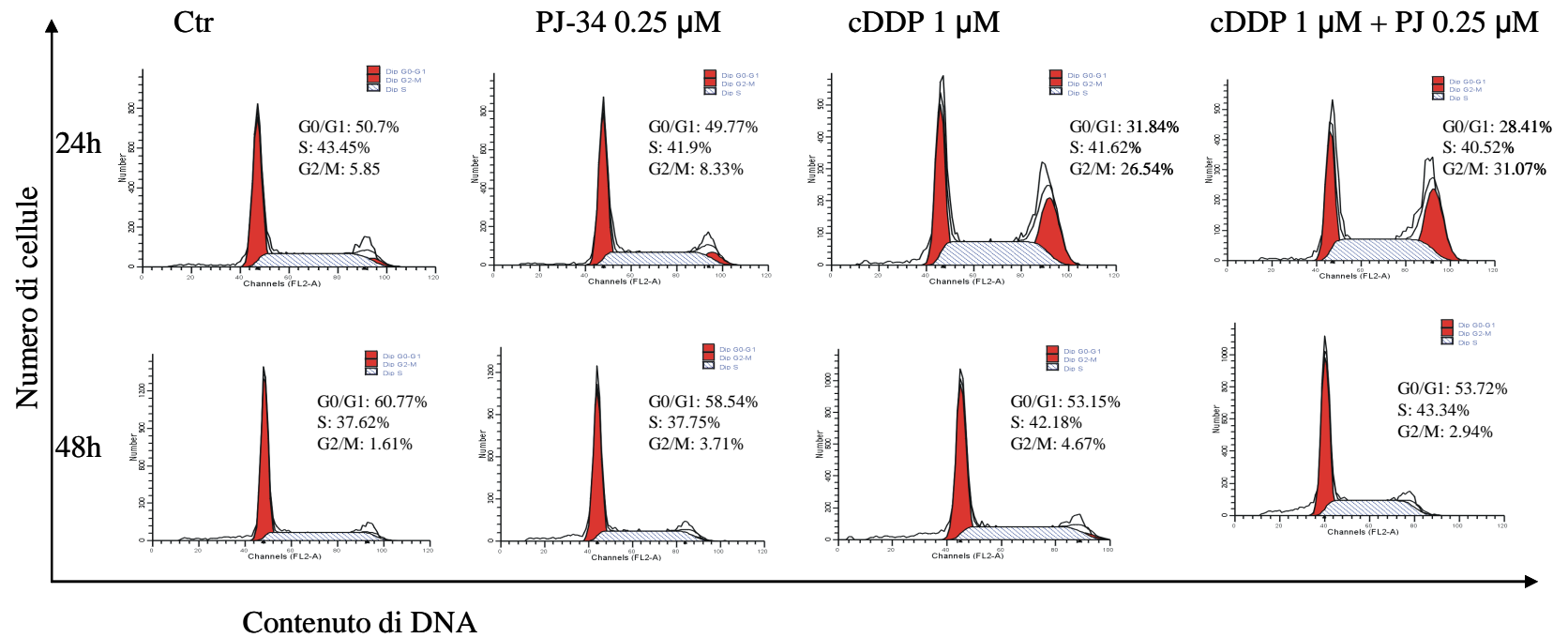


Fig. 10. Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria nelle cellule HeLa

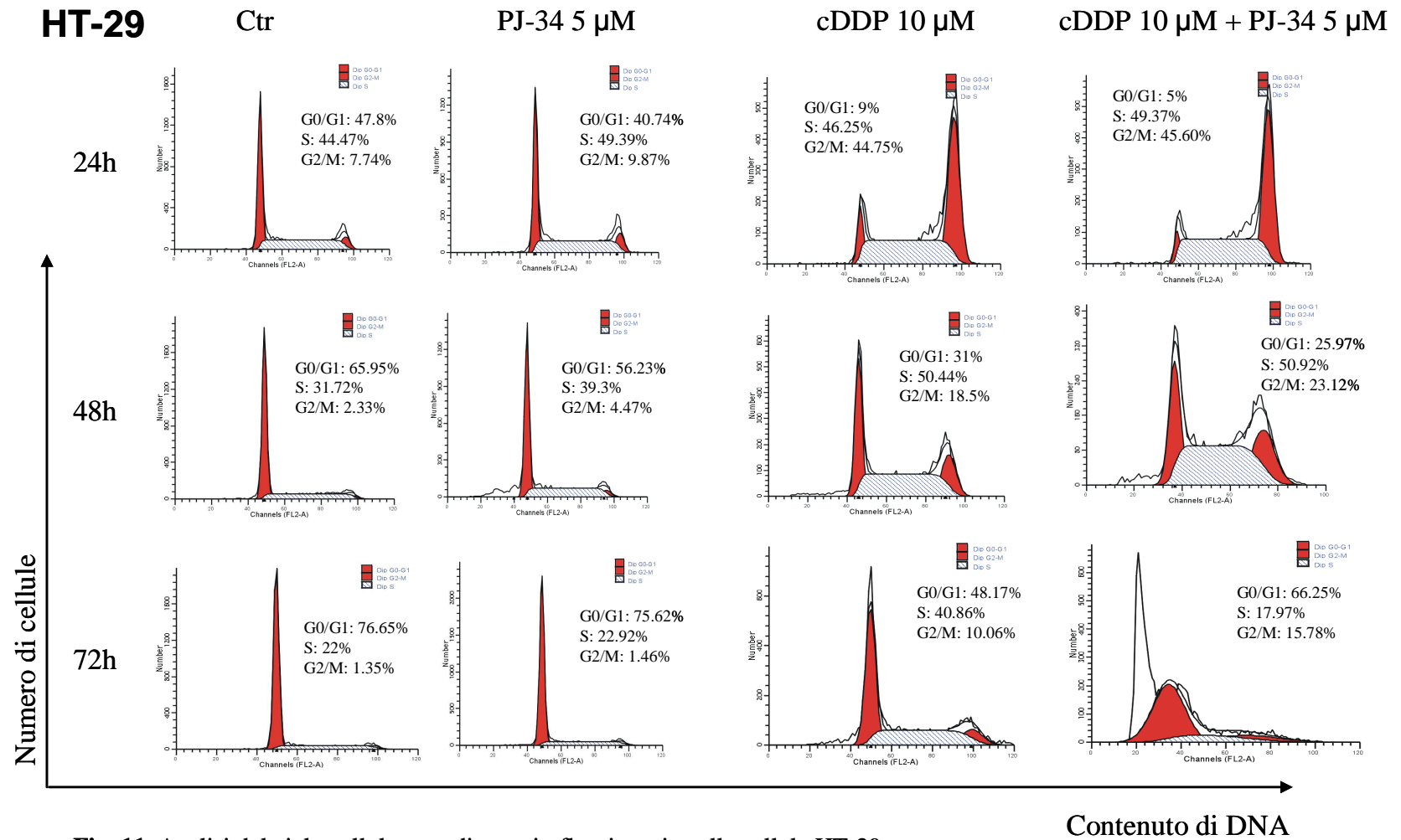


Fig. 11. Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria nelle cellule HT-29

CAPITOLO II

Definizione del coinvolgimento di PARP-1 nella segnalazione del danno al DNA indotto da cDDP

2.1-Analisi dei livelli endocellulari basali di proteine bersaglio di poli(ADP)ribosilazione

Mediante esperimenti di western blotting, sono stati analizzati i livelli endocellulari di proteine implicate nel processo di poli(ADP)ribosilazione.

Tutte le cellule prese in esame hanno mostrato livelli paragonabili di PARP-1, PCNA (implicata nel NER), DNA-PK, per quantitativi uguali di estratto proteico caricato su gel, verificati con l'utilizzo dell'anticorpo contro l'actina (**figura 12**). Viceversa tali esperimenti hanno dimostrato in cellule HeLa e KB l'assenza di p53 a causa di una mutazione che ne impedisce la sintesi; invece p53 è risultata iper-espressa in cellule HT-29 in forma inattiva, come verificato dall'assenza di un livello apprezzabile della sua proteina bersaglio p21 (dato non mostrato). A verifica di tali risultati si sono utilizzate due linee cellulari di glioblastoma umano, U251 p53 selvatica e D54 p53 mutata.

2.2 –Definizione dei livelli di attività specifica di PARP

La verifica di un potenziale ruolo delle PARP nella segnalazione del DNA danneggiato da cDDP è stata basata sulla analisi delle variazioni dell'attività specifica, mediante saggi enzimatici “in vitro”, in cellule sottoposte a diversi trattamenti. Si è osservato che in cellule trattate con cDDP 10 μ M si verifica un'attivazione delle PARP del 150% già a 12 ore e del 250% a 48 ore. Viceversa elevando la concentrazione di cDDP a 50 μ M l'attivazione risulta essere più precoce e transiente, con un valore del 370% a 12 ore che decresce

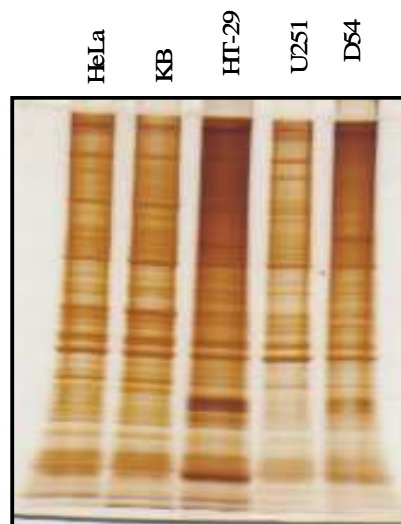
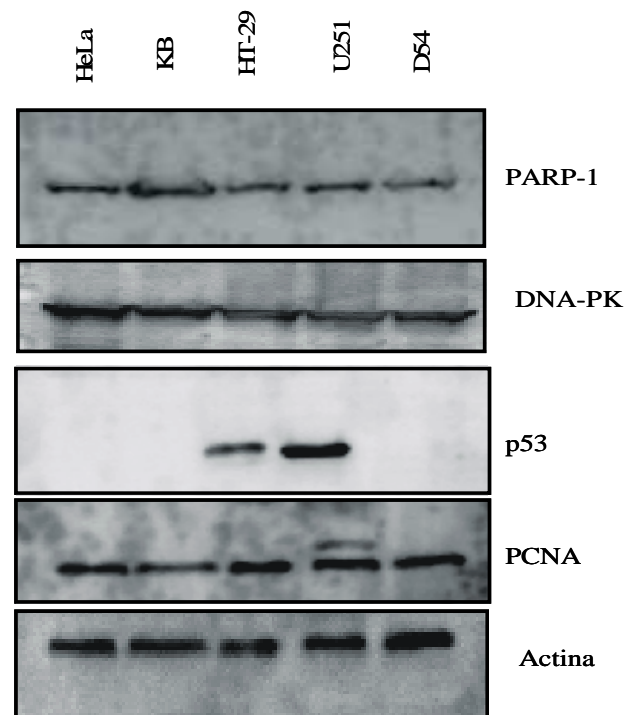
A**B**

Fig.12 Analisi dei livelli basali di proteine bersaglio di poli(ADP)ribosilazione nelle linee cellulari HeLa, KB, HT-29, U251 e D54.

- A. Colorazione del gel con nitrato di argento.
- B. Analisi per western blotting di PARP-1, DNA-PK, p53, PCNA ed Actina.

al 160% a 48 ore (**figura 13**). Tali risultati indicano un livello di danno al DNA indotto da cDDP dose dipendente che viene riconosciuto dalle PARP in modo più o meno rapido ed efficace.

2.3 -Analisi dei livelli di poli(ADP)ribosilazione

L'evidenza del coinvolgimento di PARP-1 nella segnalazione del danno da cDDP è stata verificata mediante analisi per autoradiografia e western blotting dell'entità della sua auto-modificazione. L'analisi autoradiografica di cellule HT-29 in coltura trattate con cDDP+/- PJ-34 per 48 ore ed incubate con ^{32}P -NAD⁺, ha permesso di definire, in base alla corrispondenza del segnale radioattivo con la migrazione elettroforetica di proteine native, che l'automodificazione di PARP-1 è accompagnata dalla reazione di eteromodificazione covalente di istoni (**figura 14 B**). In particolare, il segnale in corrispondenza delle bande elettroforetiche, autoradiografiche (**figura 14 A-B**) ed immunoreattive (**figura 14 C**) di tali proteine definisce che esse sono sostanzialmente modificate da corti oligomeri di ADP-ribosio. L'intensità della banda autoradiografica è significativamente incrementata nel campione trattato con cDDP 10 μM mentre in quello trattato con cDDP e PJ-34 è altrettanto significativamente ridotta. Il paragone tra le bande è reso possibile dalla verifica quantitativa dei campioni basata sulla definizione del loro contenuto in actina. Inoltre una successiva analisi densitometrica ha permesso di determinare un aumento della produzione di PAR del 120% ad opera del cDDP ed una riduzione del 60% ad opera del PJ-34. In **figura 15** è riportato come l'elettroforesi condotta su gel di poliacrilammide al 5-15% permetta di separare nella parte alta del gel una frazione di molecole di PARP-1 modificate da

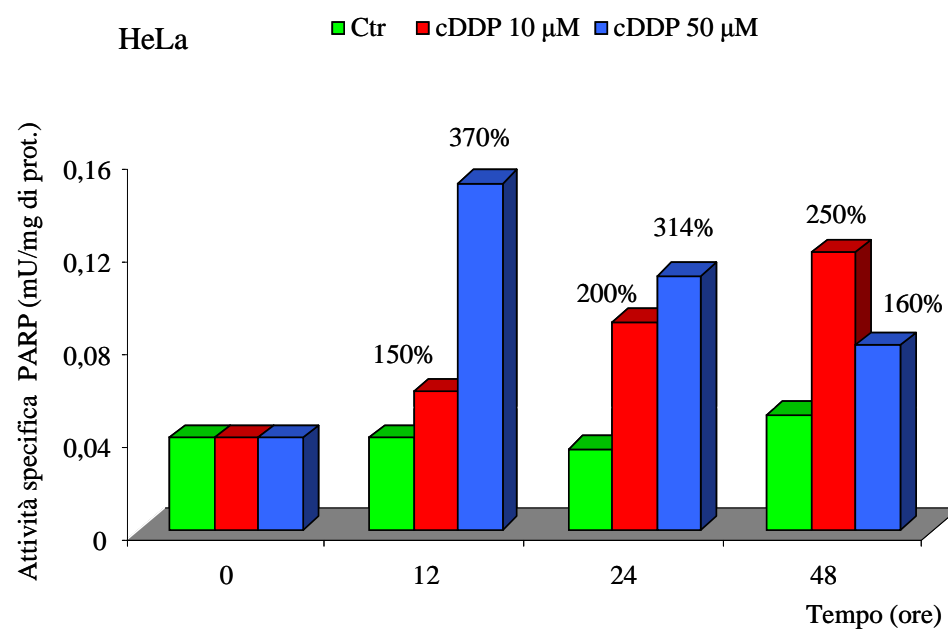


Fig. 13 Analisi delle variazioni dell'attività specifica delle PARP in cellule controllo e trattate con cDDP 10 e 50 μ M.

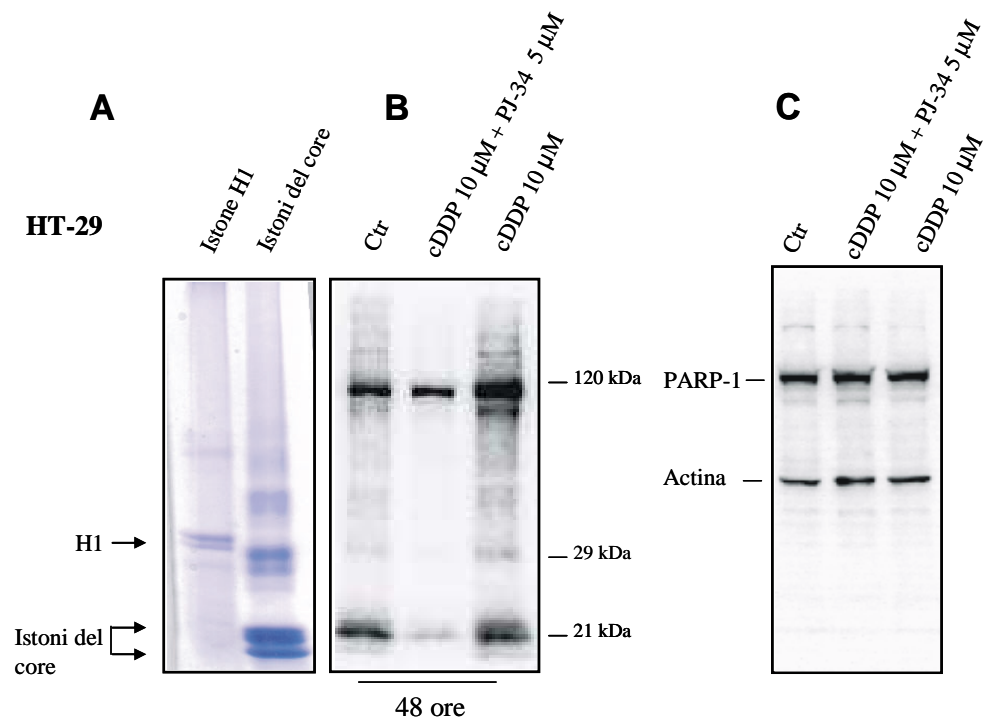


Fig. 14 Analisi dei livelli di auto- ed etero ADP-ribosilazione in cellule HT-29:

- A. Profilo elettroforetico di istoni H1 ed H2 dopo colorazione con blu coomassie.
- B. Analisi autoradiografica di cellule controllo e trattate 48 ore con cDDP 10 μM +/- PJ-34 5 μM incubati con ^{32}P - NAD $^{+}$.
- C. Analisi per western blotting con anticorpi anti-PARP-1 ed anti-actina.

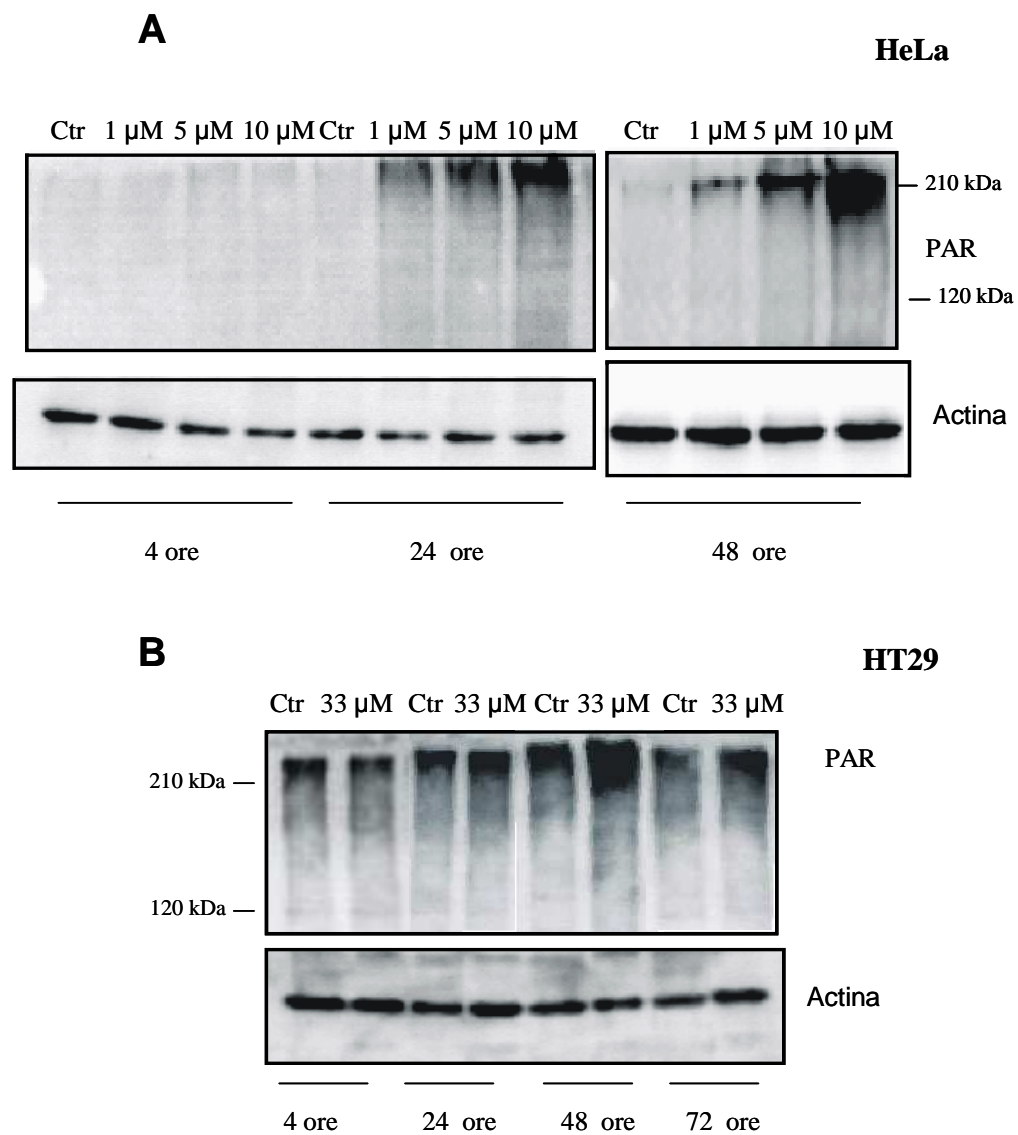


Fig. 15 Analisi per western blotting del PAR sintetizzato in cellule trattate con cDDP.

- A. Cellule HeLa controllo e trattate con cDDP 1-10 μ M.
- B. Cellule HT-29 controllo e trattate con cDDP 33 μ M.

polimeri di lunghezza superiore a 8-40 unità di ADP-ribosio in catena che, incrementandone il peso molecolare, ne ritardano la migrazione elettroforetica. Infatti analisi per western blotting, utilizzando anticorpi diretti contro il PAR, mostrano che già alla dose di cDDP 10 μ M in cellule HeLa, si rivela una zona di immunoreattività molto al di sopra della regione corrispondente al peso molecolare di PARP-1 la cui intensità aumenta a partire dalle 24-48 ore di trattamento. Risultati analoghi si sono ottenuti in cellule HT-29 nelle quali trattamenti con cDDP 33 μ M si traducono in un analogo aumento dei livelli di automodificazione di PARP-1 (**figura 15 B**). Tali risultati confermano “in vivo” la segnalazione del danno al DNA da cDDP ad opera di PARP-1 che si traduce nella sua automodificazione mediante catene di PAR molto lunghe e ramificate. Essi dimostrano inoltre che PJ-34 inibisce specificamente la fase di allungamento della reazione di poli(ADP)ribosilazione senza però modificare il tipo di accettore proteico.

2.4-Analisi dell'efficienza di inibizione da PJ-34 “in vitro” ed “in vivo”

L'efficacia di inibizione di PJ-34 è stata anche analizzata mediante saggi di attività enzimatica “in vitro”. Si è constatato che dosi di PJ-34 rivelatesi in grado di potenziare l'azione del cDDP sulla crescita cellulare sono in grado di provocare una cospicua inibizione dell'attività specifica delle PARP, pari ad un valore dell'85% già alla concentrazione 0.25 μ M (**figura 16**). Inoltre, la verifica “in vivo” dell'azione del PJ-34 è stata ottenuta mediante analisi per western blotting di campioni provenienti da trattamenti combinati cDDP+/-PJ-34 che ha mostrato, sulla base della banda immunoreattiva del PAR. E' stato osservato come l'automodificazione di PARP-1 indotta dal cisplatino mediante

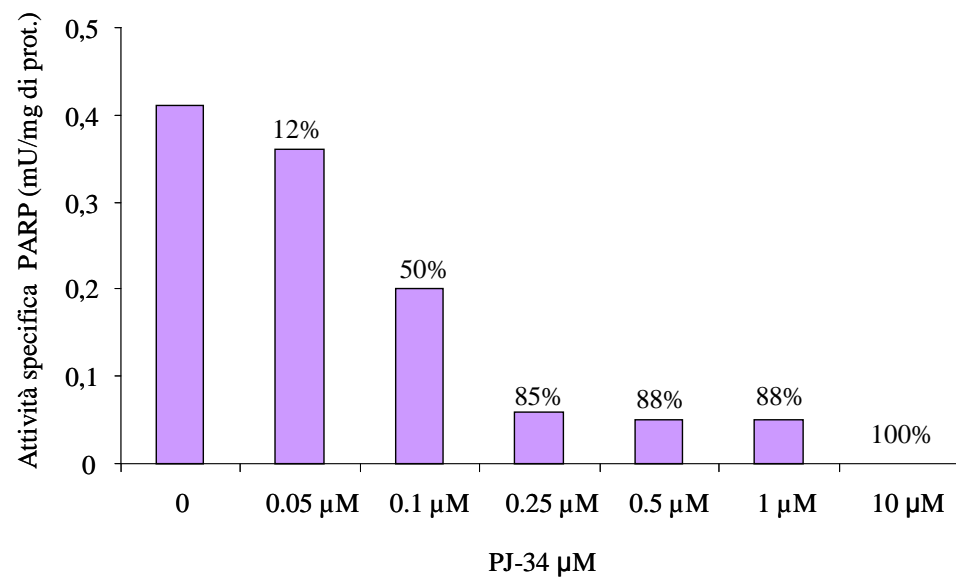


Fig. 16 Analisi dell'attività specifica delle PARP in presenza di diverse concentrazioni dell'inibitore PJ-34.

lunghi polimeri sia ridotta in presenza dell'inibitore (**figura 17**).

2.5-Analisi dell'induzione di apoptosi da cDDP

Ulteriori analisi hanno riguardato il tipo di morte cellulare indotto da cDDP a condizioni più drastiche di trattamento. In particolare è stato preso in esame il processo apoptotico caspasi-dipendente che si traduce nella comparsa del frammento apoptotico di 89 KDa di PARP-1. La **figura 18 A** mostra cellule HeLa trattate con dosi crescenti di cDDP (10-50 μ M) dove tale frammento è evidenziabile per western blotting. La determinazione dell'intensità relativa delle bande immunoreattive per PARP-1 ha rivelato che il frammento apoptotico di 89 KDa costituisce il 50-60% dopo trattamento con cDDP 33 μ M e 50 μ M rispettivamente. Inoltre cellule KB (**figura 18 B**) hanno mostrato un'analoga propensione all'apoptosi indotta da cDDP, mentre in cellule HT-29 si è osservato come la resistenza a tale agente correli con una latenza nell'innesco dell'apoptosi. La **figura 18 C** mostra infatti come in cellule trattate con cDDP 33 μ M non sia evidenziabile il frammento di 89 KDa di PARP-1 sino a 72 ore.

Tuttavia è stato verificato se l'inibizione di PARP-1 fosse in grado di indurre apoptosi in tali cellule ed a tal fine si è proceduto all'isolamento ed all'analisi di campioni di nuclei. La **figura 19 A** mostra la banda immunoreattiva per PARP-1 di 116 KDa nei nuclei controllo e di actina principalmente nella frazione citoplasmatica, a conferma di un'efficiente separazione. In nuclei di cellule HT-29 trattati con cDDP 10 μ M per 72 ore, si è confermata la presenza della banda ad 89 KDa che dimostra come l'apoptosi caspasi dipendente sia il destino cui vanno incontro anche tali cellule in seguito a citotossicità indotta da

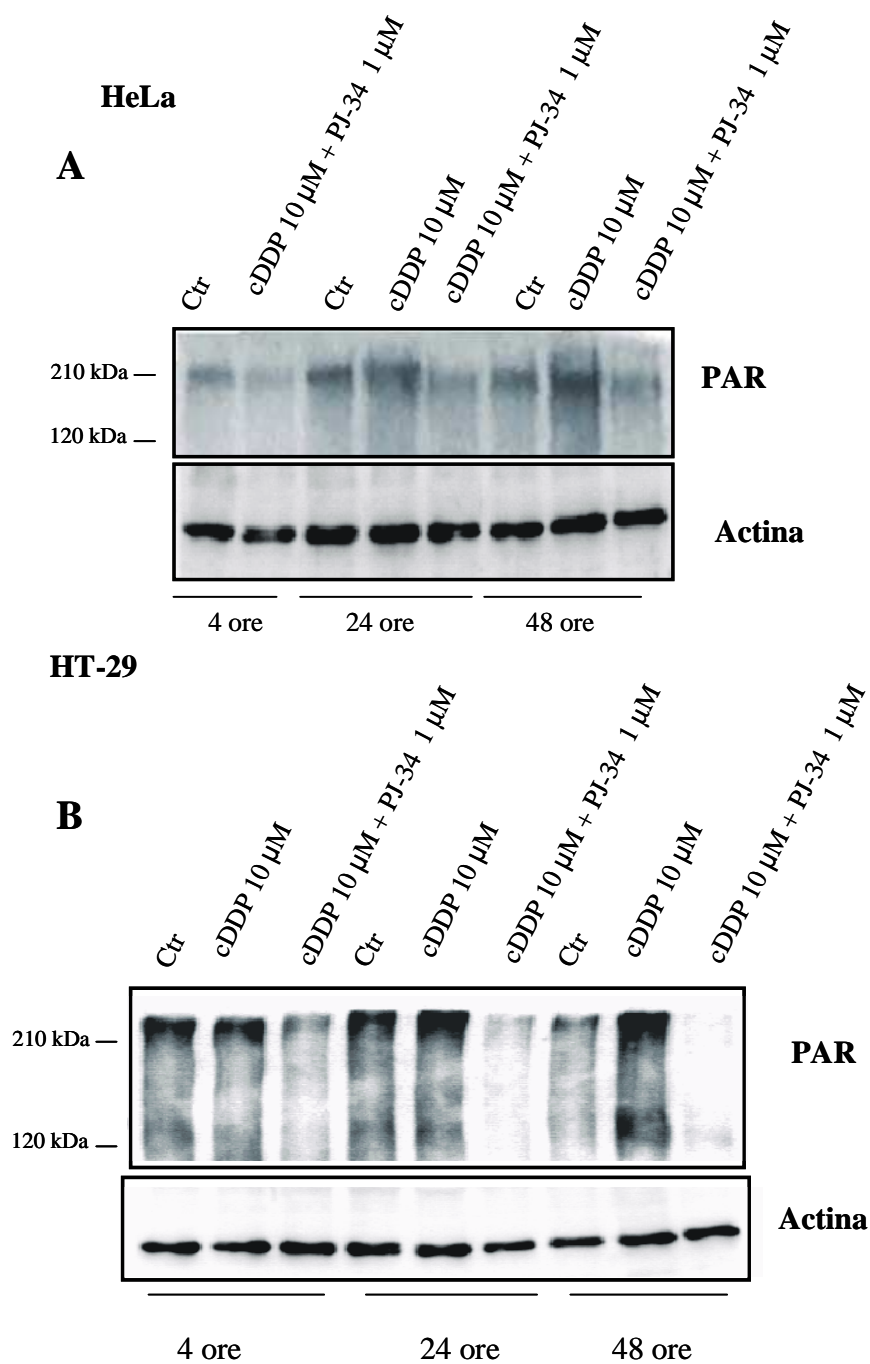


Fig. 17 Analisi per western blotting del PAR sintetizzato in trattamenti combinati cDDP +/- PJ-34 in:

- Cellule HeLa controllo e trattate con cDDP 10 μ M e cDDP 10 μ M + PJ-34 1 μ M.
- Cellule HT-29 controllo e trattate con cDDP 10 μ M e cDDP 10 μ M + PJ-34 1 μ M.

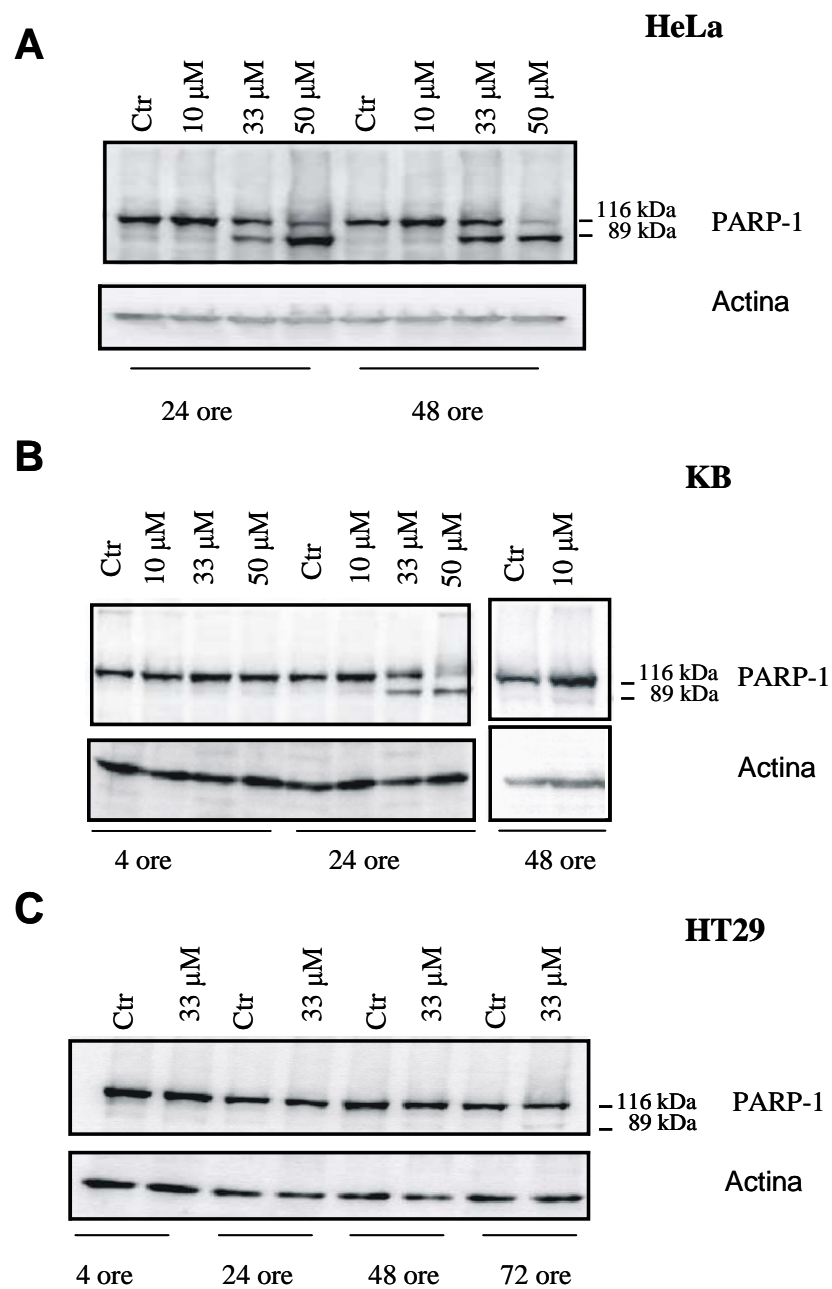
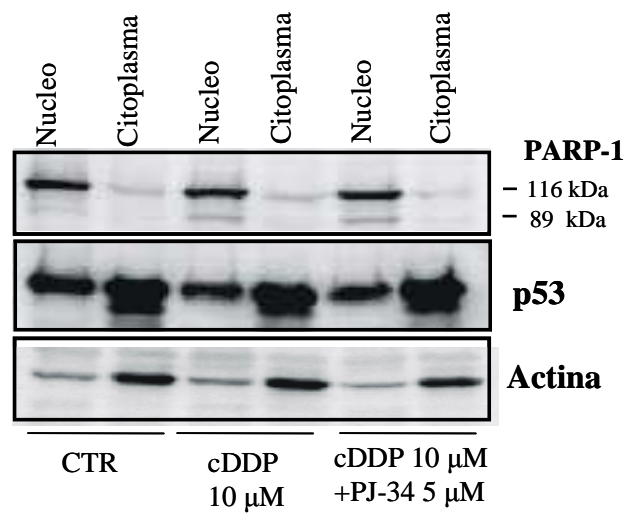


Fig. 18 Analisi del coinvolgimento di PARP-1 nell'apoptosi indotta da cDDP in:

- A. Cellule HeLa.
- B. Cellule KB.
- C. Cellule HT-29.

A



B

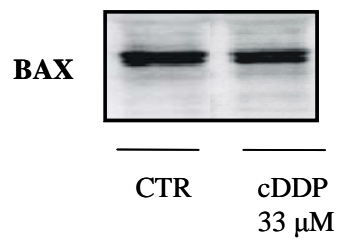


Fig. 19 Analisi dei livelli e/o localizzazione di effettori apoptotici in cellule HT-29.

- A. Distribuzione nuclei-citoplasma di PARP-1 e p53 in cellule sottoposte all'azione di cDDP 10 μ M +/- PJ-34 5 μ M per 72 ore.
- B. Livelli di espressione di BAX in cellule controllo e trattate con cDDP 33 μ M per 72 ore.

cDDP. La stessa figura mostra inoltre come in nuclei di cellule sottoposte a trattamento combinato cDDP 10 μ M e PJ-34 5 μ M , che è in grado di determinare il 30% di sinergismo sull'inibizione della crescita cellulare, sia presente il frammento apoptotico di PARP-1 in percentuale paragonabile a quella del campione trattato col solo cDDP 10 μ M. Ulteriori analisi sono state indirizzate alla definizione dei livelli di altri effettori apoptotici. Dopo aver verificato l'iper-espressione in cellule HT-29 di una p53 prevalentemente localizzata nella frazione citoplasmatica, a conferma della sua inattività, si è osservato un livello invariato di una sua proteina bersaglio quale BAX sia in campioni controllo che trattati con cDDP 33 μ M per 72 ore (**figura 19 B**). Infine si è preso in esame lo stato funzionale del fattore di induzione di apoptosi, AIF, che è noto traslocare dal mitocondrio al nucleo in risposta a diversi stimoli, per attivare l'endonucleasi G. La **figura 20 A** mostra come in nuclei di cellule HeLa, dove si conferma un'elevata percentuale di PARP-1 proteolizzata dalle caspasi, non sia altrettanto evidente una banda immunoreattiva per AIF, presente invece nella frazione citoplasmatica. Un risultato analogo è stato ottenuto in cellule HT-29 trattate con cDDP 33 μ M (**figura 20 B**) che può far concludere come il processo di apoptosi in esame, p53 indipendente, sia innescato dalle caspasi a prescindere da effettori mitocondriali come AIF.

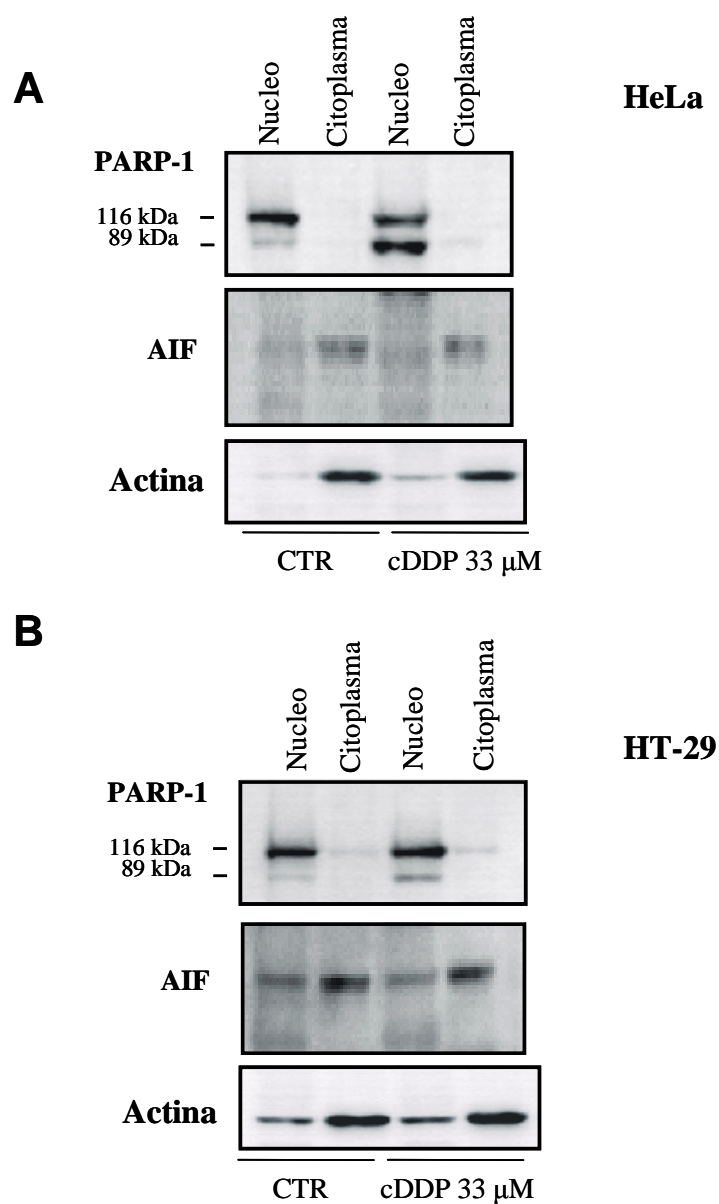


Fig. 20 Analisi della co-localizzazione di PARP-1 ed AIF in cellule HeLa ed HT-29.

- A. Distribuzione nuclei-citoplasma di PARP-1 ed AIF in cellule HeLa sottoposte all'azione di cDDP 33 μ M per 24 ore.
- B. Distribuzione nuclei-citoplasma di PARP-1 ed AIF in cellule HT-29 controllo e trattate con cDDP 33 μ M per 72 ore.

DISCUSSIONE

Come è noto la trasformazione neoplastica è associata ad alterazioni geniche che coinvolgono i meccanismi di risposta al danno genotossico e di controllo dell'integrità del genoma. D'altronde la maggior parte dei chemioterapici causa un danno al DNA e la capacità della cellula di attivare un efficiente processo di riparazione del DNA o di morte cellulare sono alla base della chemiosensibilità delle cellule tumorali. I difetti genetici causa della trasformazione sono molteplici e complessi poiché riguardano geni regolatori della proliferazione e dell'apoptosi e dipendono dal contesto biologico e dal tipo di lesione. Una delle alterazioni più frequenti della cellula tumorale è la mutazione del gene oncosoppressore p53, il cui prodotto è coinvolto nel coordinamento di processi quali il controllo del ciclo cellulare e l'apoptosi. Per ottenere una valutazione sistematica sul ruolo di p53 è stata eseguita un'analisi di 356 lavori attinenti lo stato di p53 e la farmacoresistenza (*Cimoli e coll., 2004*). Da tale studio si è concluso che il solo stato di p53 è insufficiente a determinare la sensibilità o la resistenza alla chemioterapia. In accordo con tali risultati vi è l'evidenza di come mutazioni nel gene per p53 siano strutturalmente e funzionalmente eterogenee, infatti possono portare sia alla mancata espressione della proteina che alla iper-espressione di una forma inattiva. Inoltre è emerso come l'induzione dell'apoptosi da parte di p53 possa avvenire sia in modo dipendente che indipendente dalla sua attività trascrizionale (*Yu, 2006*). E' noto che l'attività trascrizionale di p53 avviene principalmente a carico di due proteine bersaglio; p21 in grado di rallentare il ciclo cellulare per consentire la riparazione del DNA danneggiato, e mdm2 che trasloca p53 nel citoplasma

dove è degradata dal proteasoma. L'induzione dell'apoptosi trascrizione-indipendente, si basa sul legame di p53 alle proteine anti-apoptotiche Bcl-2 e Bcl-XL che permette il distacco di Bak e Bax, da esse tenute in forma inattiva.

Alla luce di tali conoscenze per il nostro progetto di ricerca abbiamo utilizzato cellule di carcinoma umano mutate in p53: sia cellule HeLa e KB che mancano della proteina sia cellule HT-29 con un elevato contenuto di una p53 inattiva. Innanzitutto abbiamo confermato come cellule mutate per p53 mostrino una differente risposta al cDDP per poi definire come tuttavia l'induzione dell'apoptosi caspasi dipendente possa avvenire anche in presenza di una p53 trascrizionalmente inattiva.

Nelle cellule HeLa e KB abbiamo verificato come la dose cDDP 33 μ M sia sufficiente a determinare una inibizione della crescita che, come verrà discusso in seguito, porta all'innescamento dell'apoptosi. Si tratta di cellule di carcinoma sia ovarico che oro-faringeo accomunate da un'elevata sensibilità al cDDP descritto in letteratura come particolarmente efficace in neoplasie dell'apparato riproduttivo (*Reeves & Adair, 2005*). Cellule di carcinoma del colon HT-29 sono risultate invece resistenti al cDDP in accordo con quanto riportato in precedenza (*Miknyoczki e coll., 2003*). Buona parte dell'insuccesso della chemioterapia dipende dall'insorgere di effetti collaterali e dalla comparsa della resistenza. Pertanto i farmaci chemioterapici vengono generalmente somministrati in combinazione, soprattutto se gli agenti adiuvanti sono attivi contro diversi processi cellulari, permettendo la riduzione dell'entità della dose così da determinare una migliore tolleranza agli effetti collaterali.

Inibitori di nuova generazione delle PARP di elevata potenza e con proprietà farmacocinetiche adatte ad essere seguiti in modelli animali, hanno mostrato di

aumentare l'attività di agenti antitumorali, come agenti alchilanti ed inibitori di Topo I (*Curtin N.J., 2005*). In accordo con tali risultati nel nostro lavoro abbiamo potuto riscontrare in cellule HT-29 un effetto sinergico dell'inibitore delle PARP PJ-34 sull'azione del cDDP sia in termini di inibizione della crescita cellulare sia in termini di perturbazione del ciclo cellulare. Infatti i nostri dati correlano con la letteratura circa il blocco in fase G2/M indotto dal cDDP, effetto che sembra essere ulteriormente alterato dalla presenza del PJ-34. Va sottolineato come l'inibitore eserciti la sua capacità adiuvante ad una concentrazione micromolare, di un ordine di grandezza inferiore a quella cui si utilizzano altri inibitori di PARP quali il prototipo 3-amminobenzammide, e paragonabile a quella con cui si utilizza CEP-6800 che è risultato efficace anche "in vivo" in combinazione con inibitori di TOPO I (*Miknyoczki e coll., 2003*). L'efficienza del PJ-34 nell'inibire le PARP è risultata molto evidente in saggi di attività enzimatica con i quali si è dimostrato come già alla dose di 0.25 μ M esso sia in grado di ridurre dell'85% l'attività specifica delle PARP. Gli stessi saggi hanno permesso di definire inoltre che il coinvolgimento delle PARP nella segnalazione della citotossicità da cDDP si basa sull'attivazione di questa famiglia di enzimi. Esperimenti di marcatura e di western blotting ci hanno portato ad osservare che tale attivazione si traduce in una estesa automodificazione di PARP-1, che è efficacemente e stabilmente inibita "in vivo" dal PJ-34. Infatti, rispetto al profilo fisiologico dell'oligo(ADP)ribosilazione covalente delle PARP e degli istoni, in seguito all'azione del cDDP si verifica un incremento dell'automodificazione di PARP-1 ad opera di polimeri più lunghi, che è specificamente inibita da PJ-34. Quindi, anche nel caso del danno al DNA indotto da cDDP (riparato sostanzialmente

per azione del NER), la modalità con cui PARP-1 interviene per stimolare la riparazione è analoga a quella descritta in letteratura per il macchinario adibito al BER.

In base anche ai nostri risultati, la reazione di auto-modificazione di PARP-1 può essere quindi definita come un segnale di riconoscimento di tipi di danno al DNA sia a singolo che a doppio filamento in relazione tuttavia alla loro entità. Infatti livelli di danno al DNA indotti da concentrazioni più elevate di cDDP determinano una attivazione di PARP-1 più rapida ma transiente seguita dalla sua proteolisi caspasi dipendente. Ciò fornisce anche una risposta alla domanda se la morte cellulare indotta da cDDP sia sempre di tipo apoptotico (*Gonzalez e coll., 2001*). In base ai nostri risultati infatti sebbene la propensione all'apoptosi delle cellule da noi analizzate correli con la loro sensibilità al cDDP, anche in cellule resistenti tale tipo di morte cellulare è attivabile. Inoltre dalle analisi condotte circa il coinvolgimento di altri effettori di apoptosi si può descrivere una via apoptotica p53 e BAX indipendente, che non richiede l'intervento di AIF nel nucleo, quindi senza deplezione di NAD e senza un'alterazione del funzionamento del mitocondrio, grazie all'inibizione di PARP-1 da parte delle caspasi, (*Cregan e coll., 2004*).

In conclusione i risultati sin qui ottenuti hanno contribuito al chiarimento del meccanismo molecolare della citotossicità del cDDP, basato sulla modulazione dello stato funzionale di PARP-1. Tali evidenze sono a favore del potenziale utilizzo di inibitori di tale enzima, come adiuvanti chemioterapici, anche in combinazione con il cDDP, secondo una promettente strategia volta al ripristino dell'apoptosi nelle cellule neoplastiche.

BIBLIOGRAFIA

- Bürkle A., Chen G., Küpper J.H., Grube K., Zeller W.J. (1993) *Carcinogenesis* 14, pp. 559-61
- Cimmino G., Pepe S., Laus G., Chianese M., Prece D., Penitente R., Quesada P. (2007) *Pharmacol. Res.* 55, pp. 49-56.
- Cimoli G., Malacarne D., Ponassi R., Valenti M., Alberti S., Parodi S. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* 1705, pp. 103-120.
- Cortes U. and Wang Z. (2005) In "poly(ADP-ribosyl)ation", cap.3 (Burker A. ed.) Landes Sciences
- Cregan S.P., Dawson V.L., Slack R.S. (2004) *Oncogene* 23, pp. 2785-2796
- Curtin N.J. (2005) *Expert. Rev. Mol. Med.* 7, pp.1-20
- Demarcq C., Bunch R.T., Creswell D., Eastman A. (1994) *Cell Growth & Diff.* 5, pp. 983-93
- Eastman A., (1983) *Biochemistry* 22, pp. 3927-33
- Eliopoulos A.G., Kerr D.J., Herod J., Hodgkins L., Krajewski S., Reed J.C., Young L.S. (1995) *Oncogene* 11, pp. 1217-28
- Fink D., Nebel S., Aebi S., Zheng H., Cenni B., Nehmé A., Christen R.D., Howell S.B. (1996) *Cancer Res.* 56, pp. 4881-6
- Gonzalez V.M, Fuertes M.A., Alonso C., Perez J.M. (2001) *Mol. Pharmacol.* 59, pp. 657-63
- Huang J.C., Zamble D.B., Reardon J.T., Lippard S.J., Sancar A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91, pp. 10394-8
- Jagtap P. & Szabò C. (2005) *Nature Rev.* 4, pp. 421-40

- *Jordan P. and Carmo-Fonseca M. (2000) M. Cell Mol. Life Sci. 57, pp. 1229-35*
- *Kigawa J., Sato S., Shimada M., Kanamori Y., Itamochi H., Terakawa N. (2002) Gynecol. Oncol. 84, pp. 210-5*
- *Lee Kraus W. and Lis J.T. (2003) Cell. 113, pp.677-83*
- *Lowry O.H., Rosenborugh N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, pp. 256-275*
- *Malanga M. and Althaus F. R. (2005) In "poly(ADP-ribosyl)ation", cap.4 (Burker A. ed.) Landes Sciences*
- *Meyer R.G., Meyer-Ficca L.M., Jacobson E.L., Jacobson M.K. (2005) In "Poly(ADPribose)ylation", cap.1 (Burker A. ed.) Landes Sciences*
- *Miao F., Bouziane M., Dammann R., Masutani C., Hanaoka F., Pfeifer G., O'Connor T.R. (2000) J. Biol. Chem. 275, pp. 28433-8*
- *Miknyoczki S.J., Jones-Bolin S., Pritchard S., Hunter K., Zhao H., Wan W., Ator M., Bihovsky R., Hudkins R., Chatterjee S., Klein-Szanto A., Dionne C., Ruggeri B. (2003) Mol. Cancer Ther. 2, pp. 371-82*
- *Nguewa P.A., Fuertes M.A., Cepeda V., Alonso C., Quevedo C., Soto M., Pérez J.M. (2006) Med. Chem. 2, pp. 47-53*
- *Pestell K.E., Hobbs S.M., Titley J.C., Kelland L.R., Walton M.I. (2000) Mol. Pharmacol. 57, pp. 503-11*
- *Pleschke J.M., Kleczkowska H.E., Strohm M., Althaus F.R. (2000) J. Biol. Chem. 275, pp.40974-80*
- *Reeves R. and Adair J.E. (2005) DNA Repair. (Amst) 4, pp. 926-38*
- *Rolli V., Ruf A., Augustin A., Schultz G.E. (2000) In de Murcia G., Shall S., cap.2, eds. New York; Oxford Univ. Press. 35-79*

- *Schreiber V., Ricoul M., Amè J.C., Dantzer F., Meder V., Splenlehauer C., Stiegler P., Niedergang C., Sabatier L., Favaudon V., De Murcia J., De Murcia G. (2005) In "Poly(ADPribose)ylation", cap.2 (Burker A. ed.) Landes Sciences*
- *Shibata A., Kamada N., Masumura K., Nohmi T., Kobayashi S., Teraoka H., Nakagama H., Sugimura T., Suzuki H., Masutani M. (2005) Oncogene 24, pp. 1328-37*
- *Turchi J.J., Henkels K.M., Zhou Y. (2000) Nucleic Acids Res. 28, pp. 4634-41*
- *Viràg L. (2005) In "poly(ADP-ribose)ylation", cap.13 (Burker A. ed.) Landes Sciences*
- *Wang D. and Lippard S.J. (2005) Nat. Rev. Drug Discov. 4, pp. 307-20*
- *Yip H.T., Chopra R., Chakrabarti R., Veena M.S., Ramamurthy B., Srivatsan E.S., Wang M.B. (2006) Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 132, pp.317-26*
- *Yu Q. (2006) Drug Resist. Updat. 9(1-2), pp. 19-25.*
- *Zhou C., Huang P., Liu J. (2005) Biochem. Biophys. Res. Commun. 336, pp. 952-60*